



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA
PÓS-COBERTURA EM ÉGUAS SUSCEPTÍVEIS**

LUCAS SANTIAGO GOMES BRASILEIRO

**BOTUCATU - SP
DEZEMBRO/2020**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA
PÓS-COBERTURA EM ÉGUAS SUSCEPTÍVEIS**

LUCAS SANTIAGO GOMES BRASILEIRO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

BOTUCATU - SP
DEZEMBRO/2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Brasileiro, Lucas Santiago Gomes.

Efeito do meio condicionado por células tronco
mesenquimais na resposta inflamatória uterina
pós-cobertura em éguas susceptíveis / Lucas Santiago Gomes
Brasileiro. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Éguas - Doenças. 2. Endometrite. 3. Células-tronco
mesenquimais. 4. Imunomodulação. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Égua; Endometrite; Imunomodulação; Meio
condicionado.

Nome do autor: Lucas Santiago Gomes Brasileiro

Título: EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS-COBERTURA EM ÉGUAS SUSCEPTÍVEIS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Central de Reprodução Animal LUBBREEDING – Cesário Lange/SP

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo

Membro

Universidade Federal de Jataí

Data da defesa: 03 de Dezembro de 2020.

À minha mãe Antonizete, as minhas filhas Letícia e Lívia, a minha avó Fransquinha, o meu irmão Felipe, meu Sobrinho Tito, aos familiares e amigos, muito obrigado pela força, companheirismo, apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me ajudado até aqui e me dado força para superar todos os obstáculos e dificuldades e não ter me deixado desistir nos momentos mais difíceis

À minha família, em especial, minha mãe, minha vó e meu irmão pelo apoio.

Às minhas filhas, Leticia e Lívia, que apesar de tão pequenas e frágeis, foram o meu impulso para poder terminar esta empreitada.

À Ianna, pelo apoio e por cuidar das meninas e de tudo na minha ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga, pelos ensinamentos e principalmente por ter me acolhido e acreditado em meu potencial.

À UNESP – Botucatu, em especial ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a todos os professores por terem contribuído com o meu crescimento profissional e pessoal, pela troca de experiências e convivência diária, por terem me acolhido e proporcionado quatro anos de aprendizado e muitas amizades.

A equipe de pós-graduandos do CERAN, pela convivência diária, por toda a ajuda, troca de experiências, e companheirismo em todos os momentos.

Aos funcionários, Edvaldo, Felipe e Evandro, pela amizade construída durante esta trajetória.

A central de reprodução equina EQUICENTER em especial a Médica Veterinária Rafaela Soares pelos ensinamentos e amizade e por ter aberto as portas e cedido os animais para a realização do experimento.

Aos amigos Lucas Canuto, Lorenzo, Lorena, Charolês, Humberto, Roberto Jr, Lucas Troncarelli, Sidnei, Thais, Veronica, Laiza, Eriky, Carolina Okada, Cesar Araújo, Campoamor, Giovane, Evandro, Dr Zezé, Bruno Ohta, Emanuel e Daniel o meu muito obrigado pelo companheirismo, amizade, e ajudas nos momentos acadêmicos e de lazer.

A família Mendonça em especial a Mari e dona Augustinha, pelo acolhimento e amizade que me fizeram ser parte desta família.

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

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para que este sonho se tornasse realidade.

RESUMO

BRASILEIRO, L. S. G. EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS-COBERTURA EM ÉGUAS SUSCEPTÍVEIS. Botucatu – SP. 2020. 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A endometrite é a principal causa de subfertilidade na espécie equina. Essa enfermidade caracteriza-se pelo acúmulo de líquido no interior do útero, influxo de células polimorfonucleares para o lúmen uterino, exacerbada expressão de mediadores pró-inflamatórios e, conseqüentemente, baixas taxas de fertilidade. Nos mamíferos em geral, logo após o contato do sêmen com o endométrio, ocorre uma resposta inflamatória a fim de eliminar espermatozoides mortos, debris celulares, plasma seminal e micro-organismos que são carregados no momento da cópula/inseminação artificial (IA). As éguas podem ser caracterizadas como resistentes ou susceptíveis a endometrites; aquelas que são resistentes possuem a capacidade de modular a resposta inflamatória uterina até 48 horas após a cobertura/IA, enquanto as susceptíveis não tem essa habilidade. Os tratamentos mais comumente utilizados para a endometrite são as lavagens uterinas, administração de drogas ecbólicas, antibióticos e anti-inflamatórios. Com o avanço de técnicas de terapia celular com capacidade de modular a resposta inflamatória, diferentes tratamentos vêm sendo estudados com resultados promissores no tratamento da endometrite em éguas. Um modulador de resposta inflamatória que vem sendo estudado e se mostra como uma possibilidade terapêutica para o tratamento de éguas com Endometrite Persistente Pós-Cobertura (EPPC) é o meio condicionado de células tronco (MC). Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo revisar os fatores relacionados a endometrite em éguas e o desenvolvimento de terapias celulares, em especial as células tronco e o meio condicionado (MC) de células tronco mesenquimais. Foram selecionadas éguas com histórico reprodutivo conhecido, classificadas como susceptíveis a EPPC. Eram realizados acompanhamentos diário por palpação retal e ultrassonografia até o momento da indução da ovulação. As éguas eram inseminadas em ciclos estrais consecutivos. Para o ciclo controle, as éguas não receberam nenhum tratamento pré IA. No ciclo tratado, 30 mL de MC foi infundido no útero das éguas 24 horas antes da IA. No momento da indução da ovulação, 6 horas e 24 horas pós IA foram realizadas coletas de material para exame bacteriológico, citológico e para dosagem das citocinas. Neste trabalho foi possível observar que tanto o crescimento de bactérias como a recuperação embrionária obtiveram resultados similares entre os grupos controle e tratado. No entanto, foi observada uma diminuição significativa na contagem de PMNs na citologia uterina 6 e 24 horas pós-

cobertura, no grupo tratado com MC ($p < 0,05$). No que diz respeito às interleucinas, observamos que para a IL-10 não houve diferenças entre os grupos controle e tratado ao longo dos tempos. Porém, o grupo controle apresentou um aumento numérico após inseminação - fato que não ocorreu no grupo tratado. Para o TNF- α também não houve diferenças entre os grupos, mas observou-se um decréscimo numérico nos tempos 6 e 24 horas no grupo tratado. No que se refere a IL-6, foi observada a diferença entre os grupos. No grupo controle houve diminuição nos tempos 6 e 24 horas em comparação ao tempo 0 hora - o que não ocorreu no grupo tratado. Com isso, podemos concluir que o MC foi efetivo na modulação da resposta inflamatória em éguas susceptíveis a EPPC.

Palavras-chave: endometrite, equinos, imunomodulação, terapia celular.

ABSTRACT

BRASILEIRO, L. S. G. EFFECT OF CONDITIONED MEDIUM OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE POST-BREEDING INFLAMMATORY RESPONSE IN SUSCEPTIBLE MARES. Botucatu – SP. 2020. 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Endometritis is the main cause of subfertility in the equine species. This disease is characterized by the accumulation of fluid inside the uterus, influx of polymorphonuclear cells into the uterine lumen, exacerbated expression of pro-inflammatory mediators and, consequently, low fertility rates. In mammals in general, immediately after the semen's contact with the endometrium, an inflammatory response occurs in order to eliminate dead sperm, cellular debris, seminal plasma and microorganisms that are carried at the time of copulation / artificial insemination (AI). Mares can be characterized as resistant or susceptible to endometritis. Resistant mares have the ability to modulate the uterine inflammatory response up to 48 hours after coverage / AI, while susceptible mares do not have this ability. The most commonly used treatments for endometritis are uterine lavages, administration of ecbolic drugs, antibiotics and anti-inflammatory drugs. With the advancement of cell therapy techniques capable of modulating the inflammatory response, different treatments have been studied with promising results in the treatment of endometritis in mares. A modulator of the inflammatory response that has been studied and shows itself as a therapeutic possibility for the treatment of mares with EPPC is the conditioned medium of stem cells (MC). Thus, the present study aimed to review factors related to endometritis in mares and the development of cell therapies, especially stem cells and the conditioned medium (CM) of mesenchymal stem cells. In the present study it was possible to observe that both the growth of bacteria and the embryonic recovery obtained similar results between the control and treated groups. However, a significant decrease in PMN count was observed in uterine cytology 6 and 24 hours post-coverage, in the group treated with MC ($p < 0.05$). Regarding to interleukins, we observed that for IL-10 there were no differences between the control and treated groups over time. However, the control group showed a numerical increase after insemination - a fact that did not occur in the control group. For TNF- α there were also no differences between the groups, but a numerical decrease was observed at times 6 and 24 hours in the treated group. With regard to IL-6, the difference between groups was observed. In the control group, there was a decrease in times 6 and 24 hours compared to time 0 hours, which did not occur in the treated group. With that, we can conclude

that the MC was effective in modulating the inflammatory response in mares susceptible to EPPC.

Keywords: endometritis, horses, immunomodulation, cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens ultrassonográficas em corte transversal dos cornos uterinos em éguas: (A) Uma imagem do útero equino sem edema endometrial ou acúmulo de líquido intraluminal, tipicamente visto em éguas durante o diestro; (B) o corno uterino de uma égua em estro, caracterizado pela presença de edema e com um pouco de acúmulo de líquido, (C) Edema endométrico exacerbado com extravasamento e acúmulo de líquido intraluminal em uma égua com endometrite, e (D) Presença de edema exacerbado com pregas endometriais bem evidentes e com extenso acúmulo de fluido intraluminal com presença de pontos hiperecogênicos em uma égua com endometrite. Barras de escala de 5 mm (A-D)395

Figura 2. Imagens de cultivo de microrganismos em placas: (A) Uma imagem de crescimento negativo; (B) placa com crescimento de bactéria *Escherichia coli*, (C) placa com crescimento de bactéria *Klebsiella spp*.....37

Figura 3. Citologia endometrial em éguas coradas com coloração do tipo Papanicolaou ($\times 100$). (A) Citologia endometrial negativa; neste slide, as células do epitélio do endométrio podem ser vistas com a presença de duas células inflamatórias. (B) Citologia endometrial positiva; células do epitélio do endométrio podem ser vistas neste slide, mas, ao contrário, neutrófilos hipersegmentados estão excessivamente representados neste esfregaço. Barras de escala 50 μm (A e B).40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AIES - Anti-inflamatório esteroidais
- AINES - Anti-inflamatório não esteroidais
- AMPs - Peptídeos Antimicrobianos
- CL - Corpo Lúteo
- COX - ciclooxigenase
- CTMs - Célula tronco mensenquimal
- eNOS - Oxido nítrico sintase endotelial
- EPPC - Endometrite persistente pós-cobertura
- IA - Inseminação Artificial
- Ig - Imunoglobulina
- IL - Interleucina
- IL-1Ra - Antagonista do receptor de interleucina 1
- iNOS - Oxido nítrico sintase induzida
- MC - Meio condicionado por células tronco
- NF- κ B - fator nuclear kappa-B
- NK- Celulas Natural Killer
- nNOS - Oxido nítrico Sintase neuronal
- NO - Oxido nítrico
- NOS - Oxido nítrico Sintase
- PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
- PGE - Prostaglandina E2
- PGF₂ α - Prostaglandina F2 α
- PMNs - Polimorfonucleares
- PRP - Plasma rico em plaquetas
- RRP - Receptores de reconhecimento de padrões
- TGF- β - Fator de transformação de crescimento beta
- TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

CAPITULO 1	115
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	166
2. REVISÃO DE LITERATURA	188
2.1. Endometrite Persistente Pós Cobertura – EPPC.....	188
2.1.1. Endometrite infecciosa.....	21
2.1.2. Líquido endometrial	23
2.2. Mecanismos de defesa uterina.....	23
2.2.1. Barreiras Físicas.....	23
2.2.2. Contrações uterinas.....	244
2.2.3. Inflamação local.....	266
2.2.4. Imunidade adaptativa	33
2.3. Efeitos do Plasma Seminal.....	355
2.4. Métodos de Avaliação da Condição Uterina.....	388
2.4.1. Avaliação ultrassonográfica.....	388
2.4.2. Avaliação Bacteriológica.....	40
2.4.3. Avaliação Citológica	41
2.5. Terapias de suporte aplicadas a EPPC	444
2.5.1. Medicamentos ecbólicos	444
2.5.2. Lavagem Uterina	466
2.5.3. Anti-Inflamatórios não Esteroidais	477
2.6. Terapias Imunomoduladoras aplicadas a EPPC	488
2.6.1 Anti-Inflamatórios Esteroidais (AIES).....	488
2.6.2. Lactoferrina.....	499
2.6.3. Plasma Rico em Plaquetas – PRP	50
2.6.4. Células Tronco Mesenquimais - CTMs.....	52
2.6.5. Meio Condicionado por Células Tronco – MC	555
3. REFERÊNCIAS.....	588
4. HIPÓTESE	8282
5. OBJETIVO	82
CAPITULO 2	83

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na espécie equina, as éguas normalmente atingem seu maior valor econômico através de seu desempenho atlético, e, posteriormente, através do destaque da sua prole. Isso, na maioria das vezes, ocorre quando já estão em idade avançada e, devido a esse avanço na idade, ocorre um declínio da capacidade reprodutiva e de seus índices de fertilidade. Pelo fato de as proles possuírem altos valores agregados, essas éguas permanecem por longos anos em programas de reprodução assistida, mesmo com índices baixos de fertilidade (CARNEVALE, 2008). A busca para se obter um maior número de descendentes gera um grande desafio para os profissionais médicos veterinários que trabalham com programas de reprodução assistida de equinos (SEGABINAZZI, 2016).

Mesmo com diversos estudos envolvendo a reprodução equina nos últimos anos, especialmente nas áreas de biotecnologias, os problemas reprodutivos de origem uterina ainda são causas de grandes prejuízos econômicos, nas taxas de concepção, nos números de serviços por concepção e sobrevivência embrionária (FIORATTI, 2010). Alvarenga et al. (2009), estimam que 30% das éguas que estão em programas de reprodução assistida possuem mais de 18 anos de idade.

Com a deposição do sêmen no útero da égua ocorre um processo inflamatório fisiológico e transitório, que tem por finalidade fazer a limpeza uterina retirando o excesso de espermatozoides e outros contaminantes que, eventualmente, tenham sido depositados junto com o sêmen.

Fêmeas que persistem com essa inflamação por mais de 48 horas após a cobertura são animais que desenvolvem uma endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) e irão apresentar falha no processo de limpeza uterina, acumulando líquido intrauterino associado a uma reação inflamatória exacerbada e persistente. Assim, irão apresentar uma queda na taxa de fertilidade e incompatibilidade no desenvolvimento embrionário (TROEDSSON, 1999). De acordo com Leblanc (2003), esta enfermidade acomete principalmente éguas multíparas com idade superior a 14 anos. Normalmente possuem um útero pendular devido ao relaxamento dos ligamentos uterinos e alterações

cervicais associadas a uma deficiência nas contrações uterinas, o que dificulta a limpeza uterina e predispõe ao aparecimento da EPPC (SEGABINAZZI, 2016).

Diante das consequências da etiologia e patogenia associada a EPPC, essa enfermidade tem grande importância nos programas de reprodução assistida, porque traz grandes impactos econômicos negativos, o que faz dessa doença a principal causa de subfertilidade em éguas (TROEDSSON, 1999).

A maior parte dos tratamentos utilizados na EPPC são consideradas de suporte, não atuando diretamente na causa da inflamação, mas apenas auxiliando na limpeza e manutenção do ambiente uterino (SEGABINAZZI, 2016).

É crescente o número de estudos, nos quais se utilizam os agentes imunomoduladores em terapias para a EPPC. Os imunomoduladores possuem a capacidade de atuar sobre os mediadores inflamatórios, diminuindo a resposta exacerbada e persistente da inflamação e melhorando, assim, os índices de fertilidade (JOHNSON et al., 2002).

Alguns agentes imunomoduladores têm sido utilizados com sucesso no tratamento da EPPC, como o uso de células tronco mesenquimais (CTMs) e o plasma rico em plaquetas (PRP). Um modulador de resposta inflamatória que vem sendo estudado e se apresenta como uma possibilidade terapêutica para o tratamento de éguas com EPPC é o meio condicionado de células tronco (MC). O MC é extraído a partir do cultivo de células tronco mesenquimais, o que o torna rico em fatores pré e pró-inflamatórios, que são liberados no desenvolvimento das células. O MC também possui ação na reparação tecidual e no controle do estresse oxidativo, agindo diretamente na modulação e reparação tecidual do endométrio (AHMADI et al., 2017; REGHINI et al., 2016).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do meio condicionado de células tronco na modulação da resposta inflamatória uterina de éguas com EPPC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Endometrite Persistente Pós Cobertura – EPPC

A fertilidade das éguas possui uma variação muito grande entre animais, devido, principalmente, ao manejo, tempo e/ou frequência de coberturas incorretas, sendo a endometrite a principal responsável pelos baixos índices de prenhez nas éguas (WATSON, 2000). A endometrite ocupa o terceiro lugar em importância entre as enfermidades, ficando atrás, apenas, da cólica e dos problemas respiratórios (TROEDSSON, 1999).

A endometrite é classificada pela sua etiologia e/ou fisiopatologia em 4 categorias: endometrite infecciosa crônica, endometrite degenerativa crônica (endometriose), endometrite transmitida por doenças infecciosas e a endometrite persistente pós-cobertura, sendo esta última a mais comum na espécie equina (TROEDSSON, 1999; ALGHAMDI et al., 2005).

A EPPC é a patologia que mais acomete a fêmea equina quando se fala em taxas de concepção (GUTJAHR et al., 2000), e a taxa de perda embrionária é três vezes maior nas éguas que apresentam esta patologia (MALSCHITZKY et al., 2003).

Assim, durante o processo reprodutivo, tanto na monta natural como na inseminação artificial, ocorre a deposição intrauterina de sêmen fazendo com que ocorra um processo inflamatório local (KOTILAINEN et al., 1994). Essa inflamação é fisiológica e transitória, sendo necessária para que ocorra a limpeza uterina eliminando os restos celulares de espermatozoides, plasma seminal, debris celulares e outros contaminantes que, eventualmente, possam estar juntos ao sêmen (TROEDSSON, 1994).

O trato reprodutivo equino possui um sistema de limpeza uterino que envolve o sistema imune do qual os restos de sêmen, fezes, urina, fungos e bactérias são removidos do útero através de mecanismos de drenagem, fatores celulares e humorais promovendo, assim, a limpeza uterina. No momento em que existe uma falha nesse *clearance* em algum desses mecanismos de defesa, ocorre a instalação de uma endometrite que irá permanecer além do fisiológico e passa a ser chamada de endometrite persistente pós-cobertura (ASBURY, 1986; ASBURY, 1987; LEBLANC, 2003).

Quanto à endometrite pós-cobertura, as éguas são classificadas como resistentes ou susceptíveis, sendo essas últimas as que não possuem capacidade de debelar o processo inflamatório naturalmente por um período de até 48 horas após o contato com o sêmen (BRITO & BARTH, 2003).

Através do processo de quimiotaxia, os espermatozoides promovem uma intensa migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) para o lúmen uterino, que serão responsáveis pela fagocitose dos restos celulares. A reação inflamatória leva a uma liberação de prostaglandinas ($\text{PGF}_2\alpha$) que irá promover contrações no endométrio, sendo essencial na limpeza uterina (TROEDSSON, 1997; TROEDSSON et al., 2002). Nas éguas susceptíveis ocorre uma diminuição na contração uterina promovendo um acúmulo maior de líquido no útero quando comparadas às resistentes. Este processo irá atuar como meio de cultura para agentes oportunistas, o que pode agravar o quadro da endometrite (LEBLANC, 2003) e fazer com que ocorra um ambiente totalmente desfavorável ao desenvolvimento embrionário (CARD, 2005).

O processo inflamatório, geralmente, está acompanhado de retenção de líquido intrauterino. No diestro o acúmulo de líquido tem relação com baixas taxas de prenhez e aumento nas taxas de morte embrionária (ADAMS et al., 1987). De acordo com Watson (2000), a importância deste líquido ainda não está bem elucidada. De 15 a 39% das éguas acumulam líquido no estro (REILAS et al., 1997; ZENT et al., 1998) e 28% acumulam no diestro (ADAMS et al., 1987).

Éguas suscetíveis, quando expostas às bactérias, acumularam 6 vezes mais líquido intra-uterino e a atividade do miométrio demora mais tempo para começar. Além de apresentar uma menor frequência, intensidade e duração quando comparadas às resistentes (TROEDSSON & LIU, 1992; TROEDSSON et al., 1993a). De acordo com LeBlanc et al. (1994), éguas sadias conseguiram eliminar 50% de um radiocolóide que foi infundido no estro em até 2 horas, enquanto as éguas suscetíveis, em 4 horas, eliminaram apenas quantidades insignificantes. Embora os mecanismos exatos de eliminação do conteúdo uterino ainda não sejam totalmente elucidados, parece que a atividade mioelétrica em resposta à inflamação seja deficiente nas suscetíveis (TROEDSSON et al., 1993b).

O estrógeno possui ação uterina durante o estro, aumentando a secreção endometrial e o edema. De acordo com Rasch et al. (1996), éguas que

acumulam líquido uterino possuem um número maior de glândulas que têm diâmetros superior quando comparadas com éguas normais, sugerindo que uma hipersecreção de muco irá contribuir no acúmulo de líquido intrauterino. É de fundamental importância a drenagem do líquido através da cérvix e do sistema linfático. Éguas que acumulam líquido no útero podem apresentar algum grau de fibrose de cérvix, tornando ineficiente o processo de drenagem (LEBLANC et al., 1995; LEBLANC et al., 1998).

A EPPC acomete éguas idosas, multíparas e que normalmente apresentam má conformação perineal e/ou cervical, útero pendular com relaxamento dos ligamentos de sustentação, cistos endometriais e deficiência nas contrações do miométrio (LeBLANC, 2003). Rigby et al. (2001), relataram uma redução tanto na frequência, intensidade e também na duração das contrações do endométrio devido às mudanças nos receptores neuromusculares para prostaglandinas e ocitocinas, apresentando uma incapacidade nas respostas aos estímulos de contração.

Existem diferenças nos padrões de contrações miométriais entre as fases do ciclo estral (TROEDSSON, 1999). No estro, a atividade de contração uterina tem características de impulsos curtos, distintos, com alta intensidade e uma sincronização bem evidente. Já no diestro, esses impulsos são difusos e com maior duração, possuem baixa intensidade e menos sincronização. Portanto, os padrões de sincronização das contrações no estro favorecem o processo de eliminação do conteúdo uterino (WOLF, 2011).

A EPPC também pode aparecer em éguas virgens e com idade avançada, sendo reconhecidas como “síndrome da égua velha virgem”, assim também como podem aparecer nas éguas virgens e jovens que apresentam um fechamento precoce da cérvix, impedindo a limpeza uterina, sendo que este problema tende a se resolver com o primeiro parto (PYCOCK, 2000).

As barreiras físicas são essenciais para proteção do útero de contaminação externa, havendo uma maior predisposição à endometrite nas éguas que apresentam injúrias causadas, principalmente, por partos e/ou má conformação perineal (HURTGEN, 2006). Alterações vulvares tanto na posição como no fechamento incompleto ou relaxamento permanente da musculatura vulvar podem causar a entrada e acúmulo de ar, fezes ou urina no trato

reprodutivo, predispondo colonização bacteriana (CASLIK, 1937; HURTGEN, 2006).

O diagnóstico para EPPC é feito após um exame completo de todo o trato reprodutivo da égua, na qual a palpação retal irá revelar um útero normalmente flácido e com acúmulo de líquido (LEBLANC, 2003). Entretanto, a ultrassonografia tem sido o método mais utilizado e mais preciso para este diagnóstico (PALM et al., 2008). Outro exame de extrema importância é o citológico uterino, no qual, normalmente encontra-se um número elevado de neutrófilos. O uso do espéculo vaginal pode revelar indícios de inflamação por toda a vagina e até da cérvix. Coleta de material para cultura pode não revelar isolamento bacteriano no swab uterino nas éguas com EPPC (LEBLANC, 2003).

2.1.1. Endometrite infecciosa

A genitália das éguas possui uma população de bactérias normais da microflora e bactérias oportunistas que podem ser patogênicas para éguas susceptíveis. Existe também uma microflora de bactérias no pênis e no sêmen de garanhões, portanto, a monta natural ainda é a forma mais comum de introdução de bactérias no útero (REILAS, 2001).

Endometrite infecciosa possui importância na reprodução equina por ser causa de subfertilidade (RIDDLE et al., 2007; WINGFIELD & RICKETTS, 1982). Normalmente, estão envolvidos microrganismos como bactérias e fungos patogênicos ou oportunistas. Estudos retrospectivos mostram que de 25 a 60 % das éguas que não emprenham possuem algum tipo de infecção uterina com causa bacteriana (COLLINS, 1964; BAIN, 1966). As bactérias mais comuns que estão envolvidas com endometrite são as de espécies *Streptococcus*, *Coliformes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (CANISSO et al., 2016; LEBLANC et al., 2009; WALTER et al., 2012; LEBLANC et al., 2007; BELTAIRE et al., 2012). A *Streptococcus zooepidemicus*, normalmente, causam endometrite aguda e a *Escherichia coli* estão envolvidas com endometrite crônica (FRONTOSO et al., 2008; ALBIHN et al., 2003). As endometrites causadas por fungos são menos comuns. Essas ocorrem de 1 a 5% e, normalmente, estão associadas a bactérias (DESCANIO et al., 2010).

A *Streptococcus zooepidemicus* é uma bactéria endêmica e comensal da mucosa do organismo, sendo a mais encontrada nos casos de endometrite, com taxas de isolamento de 66% (FERREIRO et al., 1986; WATSON, 2000). Esta bactéria também foi relacionada como agente etiológico em 15 a 20% dos abortos (WELSH, 1984).

Nas EPPC, as éguas susceptíveis são mais vulneráveis a desenvolverem infecções crônicas, e normalmente essas infecções se dão pelo fato de bactérias e fungos produzirem biofilme (FERRIS, 2017; BEEHAN et al., 2015; FERRIS, 2014). O biofilme nada mais é que um agregado complexo de microrganismos e suas secreções (STOODLEY et al., 2002) que irá proteger os microrganismos do sistema imunológico do hospedeiro (SHAH et al., 2006; JESEN et al., 1990; THURLOW et al., 2011; MUSTOE, 2004). O biofilme servirá de barreira contra antimicrobianos, resultando em resistência a tratamentos antimicrobianos, principalmente quando comparada as infecções bacterianas que não possuem o biofilme (MAH et al., 2001; BROWN et al., 1988; ANWAR et al., 1992).

Grande parte das bactérias que são isoladas do útero (80%) são capazes de produzir um biofilme (BEEHAN et al., 2015; FERRIS, 2014; FERRIS et al., 2014; FERRIS et al., 2016). Bactérias começam a produzir o biofilme por meio de moléculas sinalizadoras de células bacterianas di-GMP cíclicas (ROMLING et al., 2013; HICKMAN et al., 2005), que faz a regulação da produção de exopolissacarídeos, Pel e Psl (MERIGHI et al., 2007; HAY et al., 2009; KUCHMA et al., 2005). Pel e Psl são responsáveis pela fixação das bactérias em substratos e também de fixação da microcolônia no substrato e dar estabilidade ao DNA extracelular para dar suporte ao biofilme (MA et al., 2006; GHAFOR et al., 2011; JENNINGS et al., 2015; CHEW et al., 2014; VASSEUR et al., 2005).

A imunidade do hospedeiro e o microambiente são responsáveis na formação do biofilme em sistemas como a cavidade oral (MORSE et al., 2018; BERGER et al., 2018). Novos estudos são necessários para determinar como esses fatores contribuem para a formação do biofilme e desenvolvimento da patogenicidade da endometrite no útero de éguas (BEEHAN et al., 2015; FERRIS et al., 2014; FERRIS et al., 2017).

2.1.2. Líquido endometrial

O útero possui algumas funções muito importantes nas diferentes fases do processo reprodutivo. Sendo o principal local de deposição do sêmen nos equinos, realiza contrações para levar os espermatozoides até a tuba uterina, permite fixação e proporciona suporte nutricional ao conceito além de ser importantíssimo no processo de expulsão fetal (REILAS, 2001). O líquido uterino se faz necessário para o processo de capacitação e fertilização espermática, assim como no desenvolvimento do embrião (TUNÓN et al., 1998).

Existem muitos estudos a respeito da infertilidade em éguas, mas pouco se sabe a respeito da resposta aguda sistêmica e da resposta imunológica local que acontece no processo de endometrite (METTE et al., 2010). Malschitzky et al., (2007b) observaram que existe diferença no ambiente uterino da égua do primeiro diestro da estação reprodutiva, quando comparado aos demais ciclos subsequentes. Comparando o conteúdo uterino de éguas resistente e susceptíveis Malschitzky et al., (2008) verificaram que existem diferenças na composição proteica entre os grupos. De acordo com Malschitzky et al., (2007a), também existem diferenças no perfil proteico da secreção endometrial em éguas nas diferentes fases do ciclo estral. O líquido do endométrio é de fundamental importância para a reprodução de mamíferos, e a qualidade do ambiente uterino é determinante para prever o desempenho reprodutivo de uma fêmea (WOLF, 2011).

2.2. Mecanismos de defesa uterina

2.2.1. Barreiras Físicas

A vulva, vestíbulo vaginal, vagina e cérvix são as barreiras naturais do trato reprodutivo da égua que impedem a entrada de patógenos externos para o útero. Quando ocorre falha em alguma dessas barreiras e, principalmente, na vulva, quanto a sua conformação ou fechamento incompleto, pode ocorrer a entrada de ar na vagina, predispondo a entrada também de microrganismos que podem colonizar o útero e causar uma infecção uterina que predispõe uma endometrite (CASLIK, 1937; LEBLANC et al., 1995; TROEDSSON, 1999; DESCANIO et al., 2011).

A vulva é a porção do trato genital feminino comum tanto ao sistema urinário quanto ao reprodutor (GINTHER, 1979; LEY, 2006; ROCHA, 2018) e é a primeira barreira de proteção do útero para infecções ascendentes. Problemas de conformação vulvar normalmente estão associados à má condição corporal, idade avançada e partos múltiplos que podem provocar lacerações perineais (PYCOCK, 2003).

Foi desenvolvida uma cirurgia para correção vulvar denominada de vulvoplastia, que tem por finalidade corrigir em partes a conformação vulvar e minimizar a entrada de bactérias para o lúmen uterino (CASLICK, 1937; SILVA, 1983; McCUE, 2009).

Um estudo retrospectivo realizado por Hemberg et al. (2005) relatou que uma inadequada coaptação vulvar predispõe a infecção uterina, na qual estes observaram que 81% das 171 éguas com conformação de vulva normal apresentaram um endométrio sadio no exame citológico, enquanto as éguas que não passaram por cirurgia corretiva, apenas 46% apresentaram citologia sadia.

2.2.2. Contrações uterinas

O processo de contração uterino se inicia cerca de 30 minutos após a deposição do sêmen no útero. Nesse processo, os movimentos de contração irão auxiliar os espermatozoides se deslocarem até a tuba uterina e, em aproximadamente 4 horas pós-deposição do sêmen, um número suficiente de espermatozoides já terá atingido o local de fertilização. Após esse processo, os movimentos de contração uterina ocorrem com função de limpeza do útero, eliminando restos de espermatozoides, plasma seminal, debris celular e outras partículas que eventualmente tenham entrado junto com o sêmen (BRINSKO et al., 1991; TROEDSSON, 1999).

A contração ocorre na membrana plasmática das fibras lisas que compõem a musculatura uterina. Esse processo se dá por meio da despolarização e repolarização dessa membrana (FIORATTI, 2013). O não funcionamento do processo de contração uterino em éguas susceptíveis pode ter vários fatores envolvidos como: a falha no processo de drenagem linfática, mudanças na posição do útero, alterações vasculares do endométrio, alterações degenerativas, falhas no sistema neuromuscular, da resposta humoral e falhas

nos padrões de liberações de ocitocinas e prostaglandinas (RIGBY et al., 2001; LEBLANC, 2003), levando a uma ineficiente limpeza uterina e, consequente, instalação de uma EPPC (TROEDSSON, 1999).

De acordo com Reitzenstein et al. (2002) existem diferenças nos padrões de contrações uterinas entre éguas resistentes e susceptíveis. Nas éguas resistentes, as contrações tendem a ocorrer em direção a cérvix, favorecendo a eliminação do acúmulo de líquido uterino. Nas éguas susceptíveis o processo de contração acontece no sentido oposto, ou seja, em direção aos cornos uterinos. Há diferenças entre éguas resistentes e susceptíveis quanto à intensidade, frequência e duração das contrações da atividade uterina quando o endométrio teve contato com bactérias (TROEDSSON et al., 1993). LeBlanc et al. (1998) demonstraram uma falha no processo de contração uterina em éguas susceptíveis, em que as mesmas apresentaram um tempo maior para eliminação do radiocolóide quando se utilizou a cintilografia em comparação com as éguas resistentes.

O óxido nítrico (ON) é um gás que faz parte de vários processos fisiológicos e patológicos. É sintetizado a partir de células do processo inflamatório como os macrófagos e neutrófilos, além de células epiteliais e endoteliais (ALGHAMDI & TROEDSSON, 2002). O óxido nítrico participa de outras funções, além da inflamação como participação na defesa imune, na neurotransmissão, no processo de coagulação, no controle do tônus vascular, produção de hormônios, na diferenciação celular, expressão gênica e está presente na fisiologia ovariana (MOIRA et al., 1998). Rodeberg et al., (1995) descreve o óxido nítrico como uma importante molécula de sinalização intra e intercelular. Uma das funções de maior importância do ON na fisiologia reprodutiva é regular a contratilidade uterina espontânea (Buhimschi et al., 1995).

É através da oxidação do aminoácido L-arginina que ocorre a produção do óxido nítrico, sendo este processo dependente da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (RODEBERG et al., 1995). Robbins et al., (1999) relatam que existem três tipos de NOS, a neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e a induzível por citocinas (iNOS). Já foram descritas expressões dessas enzimas nas superfícies, tanto do epitélio glandular como nas células do tecido conjuntivo do endométrio e do miométrio. A iNOS foi descrita nos macrófagos e produz

grande quantidade de ON por longos períodos (EKERHOVD et al., 2000). Bulbul et al. (2007), observaram a expressão da nNOS e da eNOS em fibras nervosas e a expressão da nNOS e da iNOS no endotélio vascular e musculatura lisa uterina.

A enzima guanilato ciclase está difundida nas células da musculatura lisa e uma vez ativada pelo óxido nítrico, provoca um aumento nos níveis de cGMP que tem como consequência um relaxamento da musculatura lisa (BUHIMSCHI et al., 1995; ANGGARD, 1992).

O ON, sendo um mediador da atividade contrátil da musculatura lisa, pode induzir um relaxamento da musculatura uterina, inibindo, assim, contrações miométriais (ALGHAMDI et al., 2005) já que não foram observadas diferenças nas concentrações de ocitocina e $\text{PGF}_2\alpha$ entre éguas susceptíveis e resistentes após serem inseminadas (NIKOLAKOPOULOS et al., 2000a). A quantidade de ON convertido através da enzima NOS muda de acordo com as circunstâncias, que podem ser do tipo fisiológica ou patológica, causando mudanças nos padrões dessas contrações espontâneas (JABLONKA-SHARIFF et al., 1999; SAXENA et al., 2000).

Alghamdi et al. (2005) sugerem que o ON, por ser um mediador do relaxamento da musculatura lisa, seja responsável por manter a atividade mioelétrica baixa entre 7 e 19 horas a partir do início do processo inflamatório nas éguas susceptíveis a EPPC. Este estudo corrobora com Fioratti (2010), que encontrou uma concentração maior de ON no fluido uterino nas éguas susceptíveis 8 horas após a IA, e após 24 horas não teve diferença entre as éguas resistentes e susceptíveis.

2.2.3. Inflamação local

O mecanismo de defesa se dá em virtude da resposta do organismo frente a um trauma, infecção, queimadura, neoplasia ou qualquer tipo de injúria tecidual (GRUYS et al., 2006), sendo este evento fisiológico e altamente organizado (WOLF, 2011). Inicialmente, ocorre uma defesa não específica contra a injúria, até que uma imunidade específica seja adquirida (SUFFREDINI et al., 1999).

O processo inflamatório agudo tem início logo que ocorre a lesão local e possui algumas características clássicas como: dor, calor, tumor, rubor e perda de função (ROBBINS et al., 1999). Durante o processo inflamatório ocorre a dilatação dos vasos próximos à região da injúria, aumentando o aporte sanguíneo local e promovendo um aumento da permeabilidade vascular. Como consequência, ocorre um extravasamento de exsudato e a formação de edema (METCALFE et al., 1997). Devido às alterações vasculares algumas células como os neutrófilos, eosinófilos e os monócitos possuem características de se aderirem e migrarem em direção ao sítio da lesão. Os neutrófilos possuem uma grande capacidade de mobilidade sendo estes os primeiros a transpor e chegarem ao lugar agredido (COLLINS et al., 1999).

Na presença de antígenos o útero possui a capacidade de resposta rápida através da liberação dos mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas E e $F_2\alpha$, leucotrienos e as interleucinas (TROEDSSON et al., 2008).

Quando ocorre o contato do sêmen com o endométrio ocorre uma reação inflamatória. A leucodiapedese é induzida pelos espermatozoides e a intensidade do influxo de PMNs é diretamente relacionada a concentração espermática. A quimiotaxia dos PMNs tem relação com a ativação do sistema complemento através dos espermatozoides, resultando na formação do C3b que é uma opsonina e do C5a que tem quimiotaxia para o espermatozoide (TROEDSSON et al., 2005).

Após ocorrer o contato do sêmen com o útero, uma intensa reação inflamatória se instala entre 4 e 24 horas, nas fêmeas que o sistema imunológico está funcionando, a grande maioria dos produtos provenientes da inflamação é removida do útero por um período de 24 a 36 horas após o início do processo inflamatório. No entanto, isso não ocorre nas éguas susceptíveis, nas quais a resposta inflamatória é exacerbada e persistente com contínua migração de neutrófilos (LeBLANC, 2003; TROEDSSON, 1999; CARD, 2005).

Na fase aguda, os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo e são atraídos através de mediadores inflamatórios por quimiotaxia, sendo responsáveis pela eliminação dos antígenos pelo processo de fagocitose (ASBURY, 1986; GALINDO et al., 2003). Os neutrófilos contidos no fluido uterino compõem o sistema de defesa celular nas primeiras 24 horas pós-cobertura e

estão presentes em maior concentração no fluído de éguas susceptíveis a EPPC, no entanto não foram observadas diferenças entre a capacidade fagocítica dos neutrófilos entre éguas resistentes e susceptíveis (FIORATTI, 2010). Todavia, observou-se que as secreções uterinas de éguas susceptíveis diminuem a capacidade de opsonização celular (TROEDSSON et al., 1993b).

O processo inflamatório crônico ocorre algumas horas após a chegada dos neutrófilos ao foco da inflamação com a chegada dos monócitos, que são atraídos, principalmente, pelos neutrófilos, colágenos, elastina, fibrinogênio e linfocinas. A inflamação crônica se caracteriza como macrofágica, realizada por macrófagos que irão fagocitar tecidos mortos e danificados, neutrófilos e o fibrinogênio. Ocorre a liberação de collagenases e elastases que vão atuar nos tecidos conjuntivos e liberar o plasminogênio ativador da plasmina. Os macrófagos atraem as interleucinas (IL) que ativam os fibroblastos, que irão produzir colágeno fazendo a reparação do tecido danificado e formando o tecido cicatricial (DELL'AQUA Jr, 2004; COLLINS et al, 1999).

As citocinas são proteínas responsáveis por estimular o sistema de defesa humoral e celular e também por ativar as células fagocíticas (FIORATTI, 2013). Assumem o papel de mensageiras entre o local da lesão e os hepatócitos responsáveis pela síntese de proteínas inflamatórias (PETERSEN et al., 2004).

As citocinas são classificadas em dois grupos: as monocinas, que são secretadas por monócitos, e as linfocinas, que são secretadas pelos linfócitos. Dentre as linfocinas, existem as que são chamadas interleucinas, que também podem ser secretadas por outros tipos celulares e possuem ação de resposta celular principalmente ligada a função dos leucócitos (TIZARD, 1998).

As citocinas têm como fonte primária tecidos adiposos subcutâneo e visceral (adipocina), estando associada a sua produção de acordo com o aumento ou diminuição da massa de tecido adiposo corpóreo (CARVALHO et al., 2006). Existem citocinas que promovem o processo inflamatório e são denominadas de pró-inflamatórias. Existem também as anti-inflamatórias que inibem a ação das pró-inflamatórias (WOLF, 2011).

As interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são as principais citocinas pró-inflamatórias, atuando na modulação da resposta inflamatória principalmente durante a fase aguda. Elas estão presentes em maior quantidade no endométrio de éguas susceptíveis

quando comparadas as éguas resistentes (FUMUSO et al., 2003). As interleucina-1Ra (IL-1Ra), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) são as principais representantes das citocinas anti-inflamatórias e atuam como inibidoras dos genes das citocinas pró-inflamatórias (DINARELLO, 2000).

A IL-1 tem como importante função aumentar a ativação de células T em resposta frente a um antígeno, sendo uma das mais importantes do sistema imune. Sua principal fonte de produção são os macrófagos, mas também podem ser secretadas pelos neutrófilos e outras células como as células endoteliais, da musculatura lisa, da glia, astrócitos, células B e T, fibroblastos e até queratinócitos. Esta produção de IL-1 é dependente de uma resposta a estimulação celular (TIZARD, 1998).

A IL-6 na fase aguda é quem primeiro induz a resposta inflamatória, aumentando a diferenciação das células B e consequentemente estimulando a produção de imunoglobulinas. A IL-6 atua de forma sinérgica com a IL-1 e com o TNF- α e são produzidas principalmente pelos macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e pelas células T-helper (TIZARD, 1998). A IL-6 possui atividade tanto como pró e como anti-inflamatórias, possuindo um papel protetor no começo do processo inflamatório agudo e também atuam na modulação de outras citocinas pró-inflamatórias. Estão presentes durante a transição da fase aguda para a fase crônica do processo inflamatório (XING et al., 1998; JONES, 2005).

O TNF- α é, principalmente, produzido pelos macrófagos ativos e são um dos maiores modificadores da resposta imune. O TNF- α promove a expressão de outras citocinas, possuem a capacidade de aumentar a resposta celular, podem promover a apoptose em células infectadas ou tumorais, podem induzir direta ou indiretamente a produção de PGE₂ induzindo a liberação de IL-1, além de induzir a produção de proteínas de fase aguda e na produção de IL-6 (TIZARD, 1998).

A interleucina-8 (IL-8) tem papel importante na quimioatração de PMNs e ainda ativa o processo de degranulação nos neutrófilos, assim como também desenvolve função quimiotática como mediador pro-inflamatório (DINARELLO, 2000; FUMUSO et al., 2006; FUMUSO et al., 2007). A IL-8 é

produzida principalmente pelos monócitos, neutrófilos e células *natural killer* (NK) (TIZARD, 1998).

A IL-10 é produzida principalmente pelas células T e B e pelos macrófagos. Tem como principal função inibir a produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α e também da quimiocina IL-8, promover proliferação das células no sítio da agressão e produção de anticorpos além de promover uma supressão da imunidade celular (MOSSER & ZANG, 2008).

Durante a fase de estro éguas susceptíveis apresentam uma maior expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, MHC II, PMN e linfócito T e uma menor expressão da IL-10, no entanto, essas mesmas éguas na fase de diestro expressam em maior quantidade as IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-10, linfócito T e PMN em comparação as éguas resistentes. No grupo das éguas resistentes, não há diferenças na expressão das IL-1 β , IL-6 e TNF- α entre estro e diestro (FUMUSO et al., 2003, FUMUSO et al., 2006, FUMUSO et al., 2007).

Fumuso et al. (2003) observaram que na fase de estro, 24 horas após a inseminação artificial não houve diferenças para as IL-1 β , IL-6 e TNF- α entre as éguas resistente e susceptíveis, e verificou, também, que entre as susceptíveis houve uma maior expressão de IL-8 e uma menor de IL-10. Para o grupo das resistentes, durante o estro, encontrou-se uma maior expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas éguas que foram inseminadas em comparação com as não inseminadas, fato que não ocorre entre as susceptíveis onde as mesmas apresentam os níveis destas interleucinas elevados independente da presença ou não de espermatozoides. No diestro foi observado um aumento considerável na expressão de IL-1 β nas duas categorias de éguas, sendo que a expressão de IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF- α , MHC II, linfócito T e PMN foram ainda maiores para as éguas susceptíveis.

Com o uso de extrato de parede bacteriana, estimulando uma imunomodulação, não foram observados diferenças nas expressões de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MHC II, linfócito T e PMN entre éguas resistentes e susceptíveis, tanto durante o estro como no diestro, no entanto, as susceptíveis se mostraram com maior expressão de IL-10 na fase de estro. A administração de extrato bacteriano nas susceptíveis na hora da IA, mostrou uma diminuição da expressão de IL-1 β e IL-6 na fase de estro quando comparadas as elas

mesmas sem o tratamento durante o mesmo período do ciclo estral (FUMUSO et al., 2006; FUMUSO et al., 2007).

Nash et al (2010b), ao desafiar o útero utilizando 4 ml de sêmen congelado (600×10^6 espermatozoides/mL) ou com 4 mL de diluente pode observar que a contagem de neutrófilos aumentou em ambos os tratamentos até 24 horas após a IA, e a concentração neutrofilica foi maior no lúmen uterino quando havia espermatozoides (citologia/ lavado de 50 mL). No exame de biópsia, a infiltração de PMNs no estrato compacto permaneceu por até 72 horas após a IA. Apesar dos resultados, os espermatozoides não influenciaram na expressão de IL-8 24 horas após IA, contrariando os dados da literatura que mostram um aumento desta quimiocina nos experimentos realizados com espermatozoides mortos para indução de resposta inflamatória.

A expressão do RNAm das interleucinas aumenta com a IA e nas éguas susceptíveis continua aumentada por um período de até 8 dias, caracterizando uma inflamação uterina persistente. Uma possível explicação para que éguas permaneçam com a reação inflamatória persistente foi proposta por Fumuso et al. (2007), os quais observaram diferenças nas expressões de interleucinas pró-inflamatórias (IL-8) e anti-inflamatória (IL-10) entre éguas resistentes e susceptíveis a EPPC. Neste estudo foi observado que nas éguas susceptíveis houve uma menor expressão de IL-10 (dificultando a resolução da inflamação) e uma maior expressão de IL-8 (prorrogando e exacerbando a reação inflamatória) devido a constante migração de neutrófilos. As diferenças nas quantidades de IL-8 e IL-10 observadas no endométrio entre as éguas resistentes e susceptíveis se mantiveram após IA num ciclo sem interferência uterina e desapareceram após um tratamento com extrato bacteriano durante o diestro, indicando que esse tratamento nas éguas susceptíveis pode contribuir na restauração da homeostase uterina minimizando os efeitos da endometrite pós-cobertura (FUMUSO et al., 2006).

Os PMNs também modulam a resposta inflamatória a partir do controle da expressão de peptídeos de defesa do hospedeiro que são chamados de peptídeos antimicrobianos (AMPs). Esses peptídeos, além da função antimicrobiana, possuem interação com as células do sistema imune inato como os neutrófilos, monócitos, macrófagos e células epiteliais, promovendo um aumento de quimiocinas e citocinas que irão recrutar leucócitos para o local da

infecção ou inflamação. Este processo de imunomodulação estimula a resposta imune inata promovendo uma cicatrização, além de estimular a imunidade adaptativa diminuindo os efeitos nocivos da inflamação para que ocorra um término da infecção (HANCOCK & DIAMOND, 2000, BROWN & HANCOCK, 2006, MOOKHERJEE & HANCOCK, 2007, LAI & GALLO, 2009).

Os AMPs são classificados como proteínas que possuem atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral) de largo espectro (MOR, 2009). A catelicidina é um dos peptídeos antimicrobianos, e na espécie equina existem 3 tipos de catelicidinas denominados de eCATH 1, 2 e 3 (TOMASINSIG & ZANETTI, 2005). A ação antimicrobiana ocorre por meio do mecanismo de membrana ativo ou por translocação através da membrana celular bacteriana. Os peptídeos precisam interagir com a membrana celular para atingirem o citoplasma e o alvo intracelular. Esta interação se dá pela ligação eletrostática entre o peptídeo carregado positivamente e as moléculas carregadas negativamente que estão na superfície externa da membrana celular bacteriana. Com isso, os peptídeos conseguem transpor a membrana celular bacteriana formando poros que quebram a integridade física da célula. A outra forma de penetração é por meio de translocação para o meio intracelular agindo na inibição da síntese da parede celular, síntese proteica, síntese de ácidos nucleicos e de atividades enzimáticas (BROGDEN, 2005).

Sobre os fungos, os AMPs atuam através da permeabilização da membrana celular, ação direta sobre as mitocôndrias (KAVANAGH & DOWD, 2004) ou através da despolarização do citoesqueleto (KOO et al., 2004). A ação sobre os vírus se dá principalmente sobre os vírus do tipo RNA envelopado e DNA, impedindo a entrada na célula hospedeira através de diferentes mecanismos ou interagindo diretamente no envelope viral (JENSSEN et al., 2006).

As catelicidinas possuem ação também sobre a regulação da expressão de interleucinas pró-inflamatórias, atuando diretamente no recrutamento de células inflamatórias e imunes (TOMASINSIG & ZANETTI, 2005). Dentro do grupo de peptídeos, as atelicidinas atuam efetivamente sobre as células estranhas ao indivíduo, apresentam função quimiotática para células do sistema imune inato, além de também serem responsáveis pela liberação de fatores de quimiotaxia, expressão de interleucinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 e

pela expressão de receptores nas células do sistema de defesa inata do hospedeiro (CHAPWANYA et al., 2009).

Em um processo inflamatório já foram detectados vários fatores quimiotáticos e os AMPs têm sido detectados nos sítios de inflamação em altas concentrações. Além de atuarem no sistema de defesa inata, esses peptídeos atuam também promovendo um aumento na produção de IgG, linfócitos T, e CD4+, aumentando assim a produção de interleucinas IL-5, IL-6, e IL-10, atuando de forma adjuvante na resposta imune adaptativa e regulando a inflamação a longo prazo (BOWDISH et al., 2005).

Em uma inflamação, quanto mais severo for o processo inflamatório, maior será a injúria ao tecido agredido e maior será a expressão de interleucinas IL-6 e IL-8 e das catelicidinas. A IL-6 regula a síntese de proteínas inflamatórias da fase aguda, a IL-8 coordena o recrutamento dos PMNs e outras células da imunidade inata para o local inflamado e as catelicidinas são as responsáveis pela regulação da expressão dessas citocinas e são os primeiros fatores quimiotáticos que aparecem após a agressão (CHAPWANYA et al., 2009).

2.2.4. Imunidade adaptativa

O processo inflamatório fisiológico que ocorre pós-cobertura no útero das éguas é um processo mediado por uma resposta imune inata, para que não ocorra uma resposta adaptativa aos espermatozoides, permitindo que um macho possa fecundar uma fêmea outras vezes (ZAYED et al., 2016).

As imunoglobulinas (Ig), também conhecidas como anticorpos, são secretadas pelos plasmócitos que são derivados dos linfócitos B (BERLOT et al., 2007). As imunoglobulinas são capazes de fazer o reconhecimento de microrganismos invasores e opsonização de bactérias por meio de células fagocitárias de forma direta ou através do sistema complemento e ainda promover a neutralização de toxinas bacterianas (MEDZHTOV & JANEWAY, 2000; TOMLINSON, 1993). As imunoglobulinas também possuem ação de modulação de citocinas, diminuindo as citocinas pró-inflamatórias e aumentando as anti-inflamatórias, além de modular a cascata de complemento (WERDAN, 2001).

A ativação do sistema complemento é de fundamental importância para que ocorra uma resposta imune (ANDOH et al., 1995). Depois de ser ativado, o sistema complemento possui a capacidade de eliminar micro-organismos por meio da opsonização ou eliminar de forma direta através da lise celular (TOMLINSON, 1993). No processo de fagocitose ocorre uma interação do complemento C3b com receptores presentes nas células fagocitárias CR1 (KRYCH et al., 1992). O sistema complemento também promove a remoção de imunocomplexos da circulação ligando-se a células apoptóticas (CHEN et al., 2010).

A presença de uma cápsula de polissacarídeos é o principal fator que determina uma virulência de um patógeno, em que esta confere uma resistência ao processo de fagocitose por não permitir uma interação com o receptor. Desta forma, a fagocitose da maioria dos patógenos encapsulados requer anticorpo e/ou complemento, pois, estes promovem uma ligação e ingestão desses micro-organismos (TOMLINSON, 1993).

Existem várias classes e subclasses de imunoglobulinas que foram isoladas no útero da égua como as IgGa, IgGb, IgGc, IgGt, IgA e IgM, mas as que se encontram em mais abundância no muco vaginal é a IgA e a que está presente no lúmen uterino é a IgG (TROEDSSON, 1999). Ambas as imunoglobulinas são produzidas localmente pelo trato genital ocorrendo uma pequena passagem passiva destas para a luz uterina. Foram encontradas concentrações mais elevadas de IgA e IgG no útero de éguas durante o estro que no diestro, e a IgM se mostrou de maneira inversa (DELL'AQUA, 2004).

Widders et al., (1984) encontraram, em grande quantidade, células produtoras de IgA no trato genital, no entanto, observou-se que as IgG estão predominantemente presente no endométrio. Quando se comparou éguas resistente e susceptível a endometrite crônica, observou-se que há uma produção significativa maior de imunoglobulinas após desafio bacteriano nos animais susceptíveis (ASBURY et al., 1980), dados semelhantes também foram encontrados por Mitchell et al., (1982), que observaram altas concentrações de IgA e de IgG no conteúdo uterino de éguas susceptíveis.

2.3. Efeitos do Plasma Seminal

Muito se tem discutido acerca do quão é importante o plasma seminal para a modulação da resposta inflamatória no útero de éguas. A influência do plasma seminal na endometrite pós-cobertura ainda não está bem elucidada. Por um lado, auxilia na limpeza uterina, por outro, possui ação negativa na fertilidade (DELL'AQUA Jr, 2004). Trabalhos descrevem que o sêmen de alguns garanhões provoca uma reação inflamatória exacerbada, em quanto que o sêmen de outros promove uma reação inflamatória mais branda, não havendo diferença em a égua ser ou não susceptível a EPPC (TROEDSSON et al., 2000; TROEDSSON et al., 2002).

Conhecer elementos e substâncias que parecem estar envolvidas na proteção ou desestabilização da membrana plasmática dos espermatozoides é de suma importância, já que a integridade dessa membrana é fundamental para o bom funcionamento do gameta masculino (PARKS & GRAHAM, 1992). Proteínas e compostos bioquímicos do plasma seminal têm sido estudados e correlacionados com a fertilidade, porém informações como origem, estrutura e funções, ainda são limitadas (McDOWELL et al., 1996). Existem proteínas no plasma seminal que recobrem a membrana espermática durante a maturação celular. Algumas funções e interações entre estas proteínas e subpopulações de proteínas de membrana podem nos sugerir porque existem diferenças de resultados dos efeitos imunológicos do plasma seminal em diferentes estudos (TROEDSSON et al., 2000).

O plasma seminal tem como ações induzir uma inflamação endometrial transitória assim como modificar tanto a duração como a intensidade da resposta imune celular aos espermatozoides (PALM et al., 2008; FIALA et al., 2007).

Estudos mostram que o plasma seminal possui ação como modulador da resposta inflamatória pós-cobertura. Palm et al. (2006) e Card (2005) relataram uma menor reação inflamatória quando utilizaram sêmen adicionado de plasma seminal, enquanto Portus et al. (2005), observaram que a presença do plasma seminal, mesmo promovendo uma maior reação inflamatória, promoveu uma redução na duração da inflamação e uma maior frequência nas contrações uterinas.

Troedsson et al. (2002) verificaram que a duração da inflamação foi mais curta quando houve presença de plasma seminal na dose inseminante quando compararam com a dose inseminante sem o plasma ou quando este foi substituído por diluente. O número de PMNs foi significativamente menor 24 horas após IA quando o plasma foi mantido.

O plasma seminal tem se mostrado um agente supressor da atividade do sistema complemento e, por consequência, da quimiotaxia e fagocitose pelos PMNs, atuando na modulação ou inibição do processo inflamatório uterino (TROEDSSON et al., 2000). A opsonização dos espermatozoides é dependente do sistema complemento e em estudos *in vitro* Alaghamdi et al. (2004) e Troedsson et al. (2005) observaram redução no processo de opsonização na presença do plasma seminal. Dados divergentes foram encontrados por Palm et al. (2008), nos quais o plasma seminal além de provocar grande infiltração de neutrófilos no endométrio foi também responsável por aumentar a expressão das interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6).

Katila et al. (2004) em um estudo de endometrite, contratilidade e taxa de prenhez em éguas inseminadas com baixas doses de espermatozoides, na presença ou não do plasma seminal, observaram um aumento de neutrófilos nas éguas que receberam sêmen com plasma e que a contratilidade uterina foi bem superior nas que não receberam o plasma, embora não haver diferenças nas taxas de prenhez entre os grupos.

Outra possível função do plasma seminal seria a proteção dos espermatozoides contra a fagocitose e destruição pelos PMNs. Autores sugerem que o plasma seminal possui ação de proteção seletiva dos espermatozoides viáveis, mas não impedem dos espermatozoides mortos de se ligarem e serem fagocitados pelos PMNs. Quando éguas são cobertas com intervalos de até 24 horas, o sêmen da segunda cobertura é depositado em um ambiente inflamado que se torna deletério para a sua motilidade (TROEDSSON et al., 2000, TROEDSSON et al., 2005).

Em um experimento onde foi induzida uma resposta inflamatória uterina com espermatozoides mortos em éguas e 12 horas após essa indução essas éguas foram inseminadas e subsequentemente obtiveram uma taxa de prenhez de 77% quando estas foram inseminadas com espermatozoides ressuspensos em plasma seminal e uma taxa de apenas 5% quando os

espermatozoides foram ressuspensos apenas em diluente a base de leite desnatado (ALGHAMDI et al., 2004).

Existem muitas divergências entre autores com relação a influência do volume inseminante e, portanto, divergem da quantidade de plasma seminal depositado no útero com relação às contrações uterinas (FIORATTI, 2013). Fiala et al. (2004), quando utilizaram doses inseminantes de 100, 500 e 1000 x 10⁶ de espermatozoides no sêmen refrigerado entre 18 a 22 horas com ou sem plasma seminal e diluído a base de leite desnatado, observaram que as éguas inseminadas com plasma e diluente, os lavados uterinos apresentaram valores maiores de leucócitos quando comparadas as éguas que não receberam plasma. O trabalho também mostrou que a intensidade da reação inflamatória era maior quando se aumentou a dose inseminante, em contra partida, quanto maior a reação, mais rápida foi à resolução do processo inflamatório.

Troedsson et al. (1998) encontraram um aumento tanto no número, amplitude como na duração das contrações uterinas quando compararam volumes inseminantes de 10 e de 80 mL. Em contrapartida, Campbell & England (2006) não observaram diferenças nas IA realizadas com um volume de 2 ou de 100 mL.

Uma possível explicação para a redução nas contrações uterinas observadas quando se utilizou baixos volumes inseminantes e consequente menor volume de plasma seminal, pode ser devido a menor quantidade de PGF₂ α (BIENLANSKI et al., 1982) e de ocitocina (WATSON et al., 1999) presentes na dose inseminante.

A identificação, assim como a quantificação das catelicidinas no plasma seminal de garanhões, poderia possibilitar a separação de animais cujo sêmen promove uma maior reação inflamatória uterina. Como, também, o conhecimento da fração proteica do plasma que é responsável pelo processo inflamatório quando em contato com a mucosa do útero, além de descobrir o que é responsável por proteger os espermatozoides viáveis, possibilitando que ocorra a fertilização mesmo em um ambiente desfavorável. Distúrbios na expressão das interleucinas tanto do útero como do plasma seminal podem ser responsáveis tanto pela magnitude como pela persistência da inflamação uterina decorrente do contato dos espermatozoides com o útero. A partir desses dados seria possível minimizar o estímulo inflamatório inicial e permitir que o útero de

éguas susceptíveis minimizasse tanto a intensidade como a persistência da inflamação e assim aumentar a sua fertilidade (FIORATTI, 2013).

Os mecanismos de expressão das interleucinas nas éguas com endometrite são pouco explorados e o entendimento dos fatores uterinos responsáveis pelo início e também pelo término da resposta inflamatória pós-cobertura são fundamentais para imunomodular a inflamação e otimizar a atividade reprodutiva das éguas susceptíveis a EPPC (FIORATTI, 2013).

2.4. Métodos de Avaliação da Condição Uterina

2.4.1. Avaliação ultrassonográfica

A palpação transretal é a condição de avaliação uterina em éguas mais antiga e mais comumente utilizada na rotina da reprodução. Possibilita avaliar o tamanho, simetria e o tônus uterino, que são maneiras úteis de avaliar uma condição reprodutiva de uma égua. A palpação é um método subjetivo de avaliação exigindo do profissional uma habilidade e experiência para a sua execução. Em grande parte dos problemas de alterações uterinas que requerem uma acurácia maior, o uso da ultrassonografia veio para facilitar a identificação e direcioná-la para um tratamento mais específico (DELL'QUA, 2004).

No exame ultrassonográfico observa-se que a dinâmica da ecotextura uterina sofre influência das fases do ciclo estral devido os níveis de hormônios esteroides ovarianos que estejam predominantes. Na fase de estro, onde predomina o estrógeno, observa-se as pregas endometriais em conjunto com áreas anecóicas dando a característica do edema uterino com uma ecotextura heterogênea. O edema uterino pode ser observado a partir do final do diestro e torna-se mais evidente com o avançar da fase do ciclo estral, diminuindo entre 48 e 24 horas antes da ovulação e devendo desaparecer por até 36 horas após a ovulação. No entanto, na fase de diestro, onde o hormônio predominante é a progesterona, as pregas endometriais não são visíveis, apresentando-se com uma ecotextura homogênea (GINTHER, 1986).

Na rotina da reprodução equina a ultrassonografia transretal permite a visualização de pequenos acúmulos de líquidos no interior do útero (GINTHER & PIERSON, 1984). Um acúmulo de líquido menor que 3 mm de diâmetro na fase do estro é considerado normal em éguas. Os graus de ecogenicidade

encontrado nos fluidos uterinos estão correlacionados com a presença e quantidade de debris e leucócitos presentes neste líquido (MCKINNON et al. 1988).

Em uma ecotextura uterina de diestro fisiológico não é para ser observados acúmulos de líquidos, sendo de fundamental importância o conhecimento prévio da fisiologia para que não ocorra confusão desse líquido com uma gestação ou cisto endometrial (SQUIRES et al., 1988; LEY, 2006). De acordo com Ley (2006), um exame ultrassonográfico do antes e após a ovulação, com o objetivo de determinar se há um acúmulo ou não de líquido intrauterino é de fundamental importância para o desenvolvimento de uma gestação.

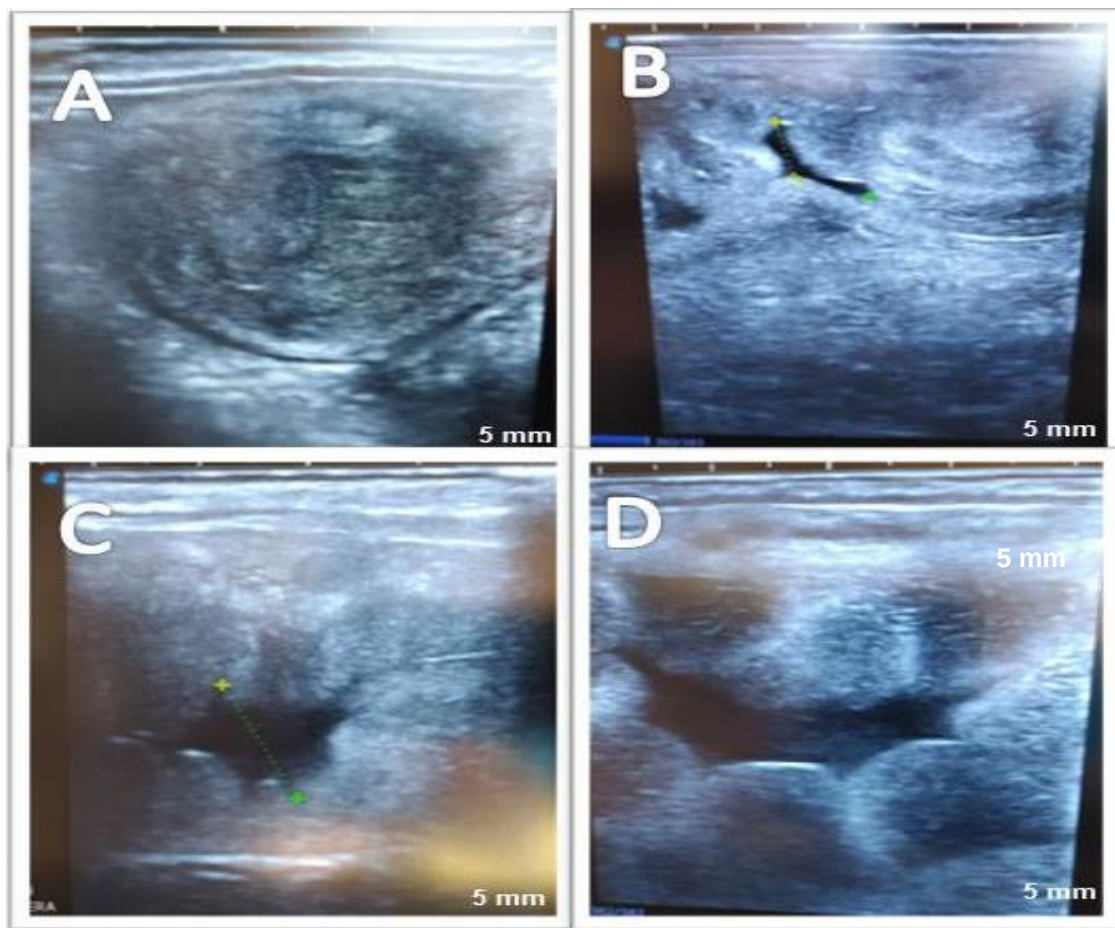


Figura 1. Imagens ultrassonográficas em corte transversal dos cornos uterinos em éguas: (A) Uma imagem do útero equino sem edema endometrial ou acúmulo de líquido intraluminal, tipicamente visto em éguas durante o diestro; (B) o corno uterino de uma égua em estro, caracterizado pela presença de edema e com um pouco de acúmulo de líquido, (C) Edema endométrico exacerbado com extravasamento e acúmulo de líquido intraluminal em uma égua com endometrite, e (D) Presença de edema exacerbado com pregas endometriais bem evidentes e com extenso acúmulo de fluido intraluminal com

presença de pontos hiperecogênicos em uma égua com endometrite. Barras de escala de 5 mm (A-D) (Arquivo pessoal).

2.4.2. Avaliação Bacteriológica

Uma cultura uterina é um método de diagnóstico que tem por finalidade determinar se o útero de uma égua está livre de alguma infecção, identificar um possível patógeno e determinar qual o melhor medicamento a ser utilizado como tratamento (McCUE, 2009). Schumacher e Moll (2007) chamam a atenção que pelo fato de o *swab* uterino ser facilmente contaminado por microrganismos do canal vaginal, não se pode utilizar apenas um resultado de cultura como forma de diagnóstico de endometrite. Deve-se sempre correlacionar o resultado positivo da cultura com achados citológicos ou histopatológicos de inflamação antes de fechar um diagnóstico definitivo.

De acordo com Ley (2006) o ideal é se obter um único *swab* uterino para a realização da lâmina de citologia e em seguida utilizar esse mesmo *swab* para a cultura e antibiograma. Existem bactérias que sua patogenicidade é questionável por alguns pesquisadores, no entanto, quando associadas a um processo infeccioso ou são observadas em grandes quantidades e com evidências de manifestações clínicas (citologia positiva, líquido intrauterino ou história de falha reprodutiva), recomenda-se o auxílio da remoção destes agentes infecciosos e detritos inflamatórios do interior do útero (LEBLANC, 2010).

Éguas com histórico de nunca terem participado de um programa de reprodução possuem baixa probabilidade de ter cultura bacteriana positiva no lúmen uterino (McCue, 2009). Hurtgen (2006) relata que éguas das raças puro sangue inglês e quarto de milha possuem uma tendência de aspirar ar pela vagina com probabilidade de contaminação bacteriana, predispondo uma contaminação do trato reprodutivo.

O achado de líquido intrauterino no exame ultrassonográfico associado a uma resposta inflamatória positiva na citologia endometrial pode estar relacionado a um *swab* positivo para cultura bacteriana (LEY, 2006). Um estudo realizado por Carvalho et al., (2011) foram observados que das 21 éguas com histórico de problemas reprodutivos 38,1% destas apresentavam acúmulo de líquido intrauterino e que 61,9% destas apresentaram cultura positiva para

Escherichia coli, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *quisimilis*, *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*.

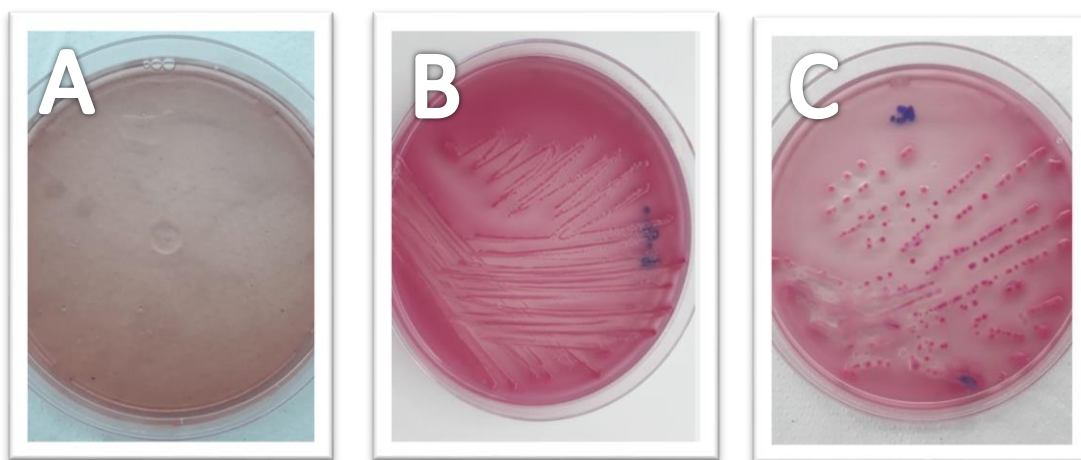


Figura 2. Imagens de cultivo de microrganismos em placas: (A) Crescimento negativo; (B) placa com crescimento de bactéria *Escherichia coli*, (C) placa com crescimento de bactéria *Klebsiella spp* (Arquivo pessoal).

2.4.3. Avaliação Citológica

A citologia uterina em éguas foi descrita por Knudsen, no ano de 1964, sendo um método de diagnostico extremamente fácil, prático e de muita utilidade na avaliação do ambiente uterino (FERRIS et al., 2015; CANISSO et al., 2016). Esse exame tem como objetivo verificar a presença ou ausência de neutrófilos e outras células inflamatórias. É um exame utilizado frequentemente na rotina da reprodução equina sendo, juntamente com a cultura uterina, o método mais utilizado para diagnóstico da endometrite (LEBLANC, 2008).

A avaliação citológica permite tomar decisões quanto ao manejo e terapêutica a ser empregada na égua. A interpretação da citologia deve ser bem criteriosa e deve-se levar em consideração o histórico do animal, resultados de palpação e ultrassonografia, além de outros exames complementares como a cultura e biopsia (FERRIS et al., 2015).

Existem alguns métodos para obter amostras de citologia como: *swab* desprotegido passado por meio de espéculo, *swab* protegido, escova citológica protegida, lavagem com baixo volume e por meio de biopsia uterina (FERRIS et al., 2015).

Segundo Alvarenga & Mattos (1990), a utilização de *swab* citológico se mostrou o método mais eficiente em relação à quantidade de material obtido por amostra. A lavagem uterina como método de obtenção de material para análise citológica se mostrou menos eficiente que o método de *swab* (BALL et al. 1988).

Logo após ser realizada a coleta da amostra, independentemente do método utilizado, o recomendado é fazer imediatamente o esfregaço (LEBLANC, 2011). De acordo com Ferris (2016), as lâminas de esfregaço devem ser secas ao ar seguidas da coloração, caso a coloração seja realizada em um período de 12 horas após a coleta, utiliza-se um fixador para manter a arquitetura celular. Lâminas secas ao ar têm menos perda de células quando comparada a outros métodos, mas o detalhe celular pode ser comprometido com a técnica. Amostras contaminadas com muco, quando secas ao ar, podem apresentar a identificação das células comprometidas, sendo necessária a utilização de um fixador para preservar o detalhe celular (LEBLANC, 2011).

A coleta de material para citologia uterina pode ser realizada em qualquer fase do ciclo estral, no entanto, o aconselhado é no início do estro quando a cérvix está aberta, sendo mais fácil e o risco de contaminação do útero é mínima (HINRICHS et al., 1988).

A avaliação das lâminas deve ser sistemática e minuciosa. Se a amostra for considerada como sendo de qualidade, a lâmina então será avaliada em uma ampliação de 1000 vezes em imersão de óleo, em múltiplos campos, examinando a presença de células uterinas, glóbulos brancos, detritos, glóbulos vermelhos, bactérias, leveduras, fungos e espermatozoides (FERRIS, 2016).

O exame citológico pode revelar padrões inflamatórios agudos e crônicos. A presença de plasmócitos, linfócitos mononucleares, macrófagos e eosinófilos quando observados e predominam na amostra refletem uma alteração crônica (LEY, 2006). Os PMNs mais comumente encontrados e utilizados na avaliação são os neutrófilos, no entanto, em alguns casos podem ser encontrados eosinófilos.

O método de avaliação da inflamação em esfregaço citológico pode ser classificado em dois métodos. O primeiro utiliza a classificação do número de PMNs por campo de alta potência, técnica onde se avaliam dez campos de alta potência (em aumento de 400 vezes) de cada esfregaço, escolhidos

aleatoriamente e analisados, sendo o número médio de PMNs encontrado entre eles, o resultado. O resultado encontrado servirá como avaliação da gravidade da inflamação no endométrio (0-2 sem inflamação; 2-5 inflamação moderada; mais que 5 inflamação grave) (RIDDLE *et al.* (2007). O segundo método se baseia na porcentagem de PMNs em relação as células endometrias, que é determinada pela contagem de 200 a 400 células totais, sem levar em conta o número de campos. Esta técnica tem sido considerada a mais adequada, uma vez que, diferentes celularidades de diferentes métodos de coleta são avaliados com o mesmos critérios.

Uma porcentagem mínima de PMNs para ser classificada como inflamação e estipular a gravidade do processo ainda difere entre autores, devido a falta de consenso sobre valores fisiológicos de PMNs na fase de estro. Para Leblanc (2011), de 0,5 a 5%. A classificação da endometrite em menor que 0,5% negativa; 0,5 a 5% leve; 5 a 30% moderada e maior que 30% como moderada foram descritas por Ricketts & Mackintosh (1987); Falomo *et al.*, (2006).

Kozdrowski *et al.* (2015), quando compararam esses dois métodos de avaliação a porcentagem de PMNs e o número de PMNs em campos de alta potência, encontraram um resultado mais sensível de endometrite nos esfregaços avaliados de acordo com a porcentagem de PMNs. Assim, o método a ser escolhido para a avaliação pode ter um impacto nos resultados, independente da forma de coleta da amostra. Ainda não existe um consenso quanto aos critérios de leitura dos esfregaços de citologia para interpretação dos resultados (OVERBECK *et al.*, 2011; CARD, 2005; COCCHIA *et al.*, 2012). Como consequência, podem apresentar resultados falsos positivos e falsos negativos, promovendo uma terapia inadequada, podendo apresentar um impacto negativo nos resultados do tratamento e na taxa de fertilidade (KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

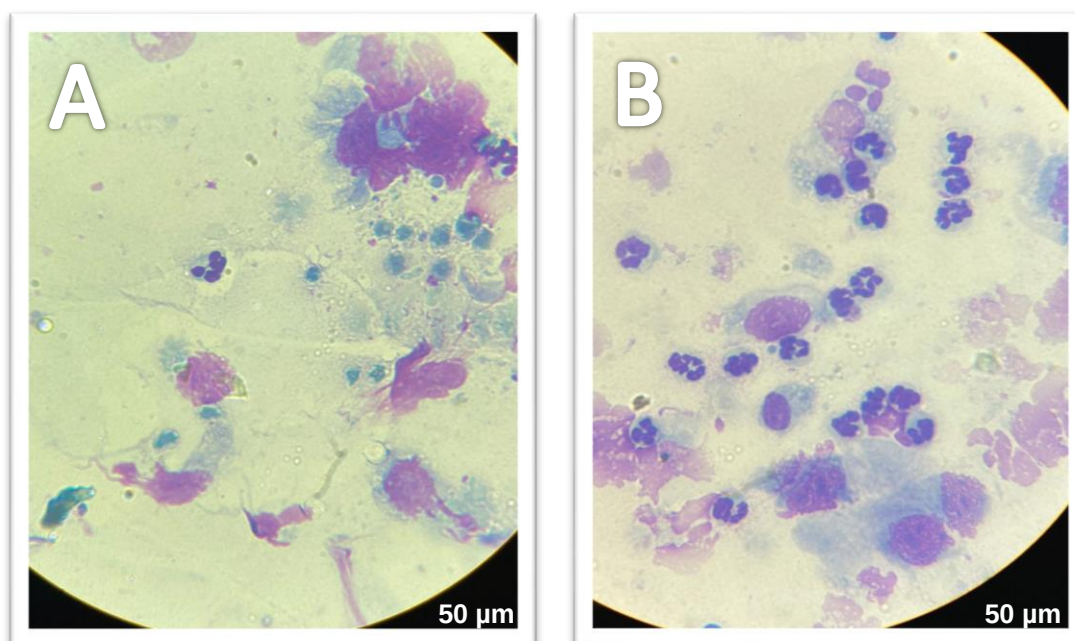


Figura 3. Citologia endometrial de éguas em estro coradas com coloração do tipo Panótico ($\times 100$). (A) Citologia endometrial negativa; neste slide, as células do epitélio do endométrio podem ser vistas com a presença de duas células inflamatórias ($< 1\%$ de neutrófilos/ campo). (B) Citologia endometrial positiva; células do epitélio do endométrio podem ser vistas neste slide, mas, ao contrário, neutrófilos hipersegmentados estão excessivamente representados neste esfregaço ($> 5\%$ de neutrófilos/ campo). Barras de escala 50 μm (A e B) (Arquivo pessoal).

2.5. Terapias de suporte aplicadas a EPPC

2.5.1. Medicamentos ecbólicos

Na rotina da reprodução equina, usa-se como medicamentos que estimulam a contração uterina para auxiliar no tratamento de éguas que acumulam fluido, os agentes ecbólicos como a ocitocina ou a prostaglandina (LEBLANC, 1994; CADARIO et al., 1995).

Para auxiliar o tratamento das éguas susceptíveis quando o acúmulo de líquido é menor que dois centímetros, a ocitocina é o fármaco de primeira escolha (STECKLER et al., 2012), sendo utilizada uma dose que vai de 10 a 20 UI, podendo ser utilizada por via intramuscular ou intravenosa, ou juntamente ao diluente de sêmen na dose de 30 UI (CAMPBELL & ENGLAND, 2002). Porém, Cadario et al. (1999), relataram que altas doses de ocitocina (25 UI) por via endovenosa podem induzir uma contração tetânica em algumas éguas, não permitindo uma drenagem ou eliminação do fluido uterino. Outros estudos

demonstraram que doses menores de ocitocina (2,5-5UI) conferiram melhores resultados na eliminação do fluido uterino quando compararam com doses maiores da droga (RISCO et al., 2009; GUTJAHR et al., 2000).

A ocitocina pode ser utilizada por até 48 horas pós-ovulação, não tendo mais efeito positivo após este período devido ao fechamento da cervix, que não permitirá mais a eliminação do líquido endometrial (TROEDSSON, 1997).

A ocitocina pode atuar de duas formas no útero da égua, podendo ser de forma direta pela estimulação das contrações uterinas nos receptores miometriais ou de forma indireta pela produção de $\text{PGF2}\alpha$ através da liberação do ácido araquidônico (CADARIO et al., 1995; GUTJAHR et al., 2000)

A eficácia do tratamento com ocitocina na eliminação de líquido uterino sofre influência de acordo com a fase do ciclo estral da égua, na qual o número de receptores miometriais para ocitocina sofre variação, sendo maior na fase estrogênica e menor na fase em que a progesterona começa a aumentar logo após o período pós-ovulação (RIGBY et al., 1999; GUTJAHR et al., 2000; VERONESI et al., 2006).

O cloprostenol é o análogo de prostaglandina ($\text{PGF2}\alpha$) mais utilizado na limpeza física do útero como promotor de contrações miometriais (FIORATTI, 2010). A prostaglandina possui a vantagem de ter um tempo de duração da sua atividade mioelétrica de até 5 horas quando comparada a ocitocina que possui um tempo de duração de apenas 45 minutos (BRENDENMUEHL, 2002; LEBLANC, 2003), no entanto, possui características semelhantes a ocitocina quando a mesma é utilizada em altas doses, onde há um padrão de contração única e prolongada, o que não permite uma limpeza uterina eficiente (NIE et al., 2003; TROEDSSON et al., 1995).

A utilização da prostaglandina e seus análogos no período periovulatório deve ser cauteloso, já que estas drogas interferem na luteogênese do CL quando utilizada após a ovulação (BRENDENMUEHL, 2002). Quando utilizada no período antes da ovulação, não possui efeito sobre a formação do corpo lúteo ou mesmo na produção da progesterona. No entanto, quando se administra pós-ovulação possui efeito na formação luteal, resultando em menores níveis de progesterona entre os dias 3 e 5 pós-ovulação e consequente redução na taxa de prenhez (BRENDENMUEHL, 2002; LEBLANC, 2003). Deste

modo, a utilização de análogos da PGF2 α é uma alternativa para éguas que acumulam líquido pré-cobertura (LEBLANC, 2003).

2.5.2. Lavagem Uterina

A técnica de lavar o útero de éguas é um procedimento muito utilizado na rotina da reprodução, principalmente nas éguas com endometrite persistente pós-cobertura, pode ser usada tanto antes como após a inseminação, tendo como principal objetivo a remoção de exsudato inflamatório e debris celulares. Quando se faz a lavagem no momento pré-inseminação tem o objetivo de tornar o ambiente uterino favorável para a deposição dos espermatozoides, sendo utilizado para a lavagem o ringer com lactato (VANDERWALL & WOODS, 2003; WATSON et al., 2000). Se a lavagem for feita pós-inseminação o intuito é remover mecanicamente os restos celulares, debris inflamatórios e outros contaminantes presentes no interior do útero que se depositaram no momento da inseminação (KNUTTI et al., 2000; LEBLANC, 2003).

O lavado pode ser realizado 4 horas após a inseminação, sendo este tempo necessário para que ocorra todo o transporte dos espermatozoides viáveis até a tuba uterina, não havendo interferências nos índices de fertilidade (BRINSKO et al. 1991; FIALA et al., 2007). Após a inseminação, quanto menor o tempo de lavagem uterina, menor será o tempo de exposição dos espermatozoides, patógenos, debris celulares e exsudatos inflamatórios com o endométrio, sendo um ponto favorável para diminuição do processo inflamatório nas éguas susceptíveis (CANISSO et al., 2016).

As lavagens normalmente são feitas com uma sonda pela técnica de sinfonagem, utilizando de 1 a 2 litros de solução para cada lavagem de acordo com o tamanho do útero ou até que o material intrauterino retirado esteja totalmente límpido (LEBLANC, 2003). Essa técnica tem se mostrado bastante eficiente nas éguas que acumulam uma coluna de líquido superior a 2 cm e/ou que apresentem líquido com pontos hiperecóticos ao exame ultrassonográfico (BRINSKO et al., 2003).

2.5.3. Anti-Inflamatórios não Esteroidais

O uso dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) tem sido utilizado como um tratamento para a EPPC, a sua eficácia ainda é questionada por muitos pesquisadores, já que este grupo de drogas atua diretamente na cascata do ácido araquidônico, bloqueando a produção da $\text{PGF}_2\alpha$, sendo esta importante para o mecanismo de contração uterina e consequentemente promover a limpeza uterina (SEGABINAZZI, 2016). Os AINES mais utilizados nas éguas com EPPC tem sido a fenilbutazona (LEBLANC, 1997), flunixin meglumine (RISCO et al., 2009) e vedaprofeno (ROJER et al., 2010).

No tratamento da EPPC, Leblanc (1997) utilizando fenilbutazona e Reilas et al. (2006) usando flunixin Meglumine, ambos observaram um atraso no processo de limpeza associado a um aumento da reação inflamatória uterina.

Roger & Aurich (2010) utilizando vedaprofeno um inibidor seletivo de COX-2 associado a ocitocina, obtiveram bons resultados em éguas susceptíveis com redução significativa no infiltrado de PMNs uterino e um aumento na taxa de fertilidade destes animais.

O firocoxib é um inibidor de ciclo-oxigenase seletivo para COX-2, com muito pouco efeito sobre as enzimas COX-1, reduzindo desta forma possíveis complicações. Quando ocorre o bloqueio da COX-2, consequentemente, há uma queda na produção de PGE, que atua diretamente na inflamação e também da PGI responsável pela vasodilatação e edema no processo inflamatório (TREBINO et al., 2003; NODA et al., 2007).

Em cavalos utiliza-se o firocoxib por via oral a cada 24 horas, alcançando concentrações plasmáticas estacionárias do quinto ao sétimo dia de tratamento (LETENDRE et al., 2008) e o pico de concentração plasmática desse fármaco é de 3,9 horas após o fornecimento da dose pela via oral (KVATERNICK et al., 2007b).

O firocoxib tem sido muito utilizado no tratamento de éguas com inflamação uterina pós-cobertura, sendo um medicamento seguro e sem efeitos colaterais que possui características como grande volume de distribuição e meia vida longa, possibilitando sua utilização a cada 24 horas, além da sua seletividade para COX-2 (FRISO, 2016).

Friso et al. (2019) em um experimento no qual se utilizou 0,2 mg / kg de firocoxib por via oral em éguas no dia da ovulação e até 24 horas pós-inseminação (três dias seguidos), o firocoxib não interferiu no tempo de ovulação das éguas que receberam acetato de desorelina como indutor de ovulação, como também não houve diferenças nas taxas de recuperação embrionária entre os grupos. Demonstrando desta forma que o firocoxib é realmente uma droga segura para ser usada em programas de reprodução assistida.

Éguas que receberam firocoxib próximo à ovulação por três dias apresentaram menor porcentagem de PMNs 24 horas após a IA quando comparado ao grupo controle. E as éguas do grupo não tratado tiveram aumento de acúmulo de líquido intrauterino após a IA (FRISO et al., 2019).

2.6. Terapias Imunomoduladoras aplicadas a EPPC

2.6.1 Anti-Inflamatórios Esteroidais (AIES)

Os anti-inflamatórios esteroidais são um grupo de medicamentos que vem sendo amplamente utilizados na reprodução equina com o intuito de melhorar as condições uterinas de éguas susceptíveis à EPPC (SEGABINAZZI, 2016).

Os anti-inflamatórios esteroidais apresentam várias funções dentre as quais estão o equilíbrio da homeostase de eletrólitos, mediação de metabólitos de carboidratos, proteínas e lipídios, além de uma potente ação anti-inflamatória (PEREIRA et al., 2002). A principal razão para o uso destes medicamentos é o fato de estarem relacionados à sua forte ação anti-inflamatória, imunomoduladora e analgésica (BOSSCHER et al., 2000; PACE et al., 2007; RASMUSSEN et al., 1998).

Uma forma de tratamento proposto para o EPPC visa a imunomodulação da resposta inflamatória pós-cobertura com a utilização parenteral de AIES (DELL'AQUA Jr. et al., 2006). Dell'aqua Jr. et al., (2006), observaram uma redução da função de neutrófilos com diminuição do fluido uterino, além de ter facilitado a limpeza do útero quando se utilizou 0,1 mg/Kg de acetato de prednisolona antes da inseminação artificial. Como resultado final deste mesmo experimento foi observado uma melhora significativa na taxa de fertilidade das éguas do grupo que tinham EPPC. A corticoterapia aumentou a

taxa de prenhes de éguas com histórico de EPPC, em contrapartida, nas éguas resistentes, não teve diferença significativa na taxa de prenhes entre os animais tratados e não tratados (PAPA et al., 2008).

A administração de dexametasona na dose de 0,1 mg/Kg reduziu significativamente o edema uterino e o acúmulo de líquido intrauterino, além de uma menor turbidez do líquido coletado, embora o número de neutrófilos não tenha sido afetado com o uso desta droga. Observou-se também um aumento na taxa de prenhes por ciclo quando este tratamento foi utilizado nos animais que apresentaram líquido uterino superior a dois centímetros após a inseminação artificial e que permaneciam no útero por períodos de até 36 horas (BUCCA et al., 2008).

A dexametasona pode ser administrada juntamente com o diluente de sêmen, sem causar danos à qualidade seminal além de reduzir de endometrite após a inseminação (FIORATTI et al., 2012).

Os glicocorticoides possuem efeito na produção de citocinas e ocorre através de ligações dos receptores de glicocorticoides no citoplasma e no núcleo celular. Esses receptores por ativar ou inibir a transcrição dessas citocinas, na qual ocorre um aumento da expressão das citocinas anti-inflamatórias e uma diminuição na expressão dos pró-inflamatórias (LÖWENBERG et al., 2008).

A dexametasona ainda promove a redução da expressão de interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6 e IL-8 e o aumento das interleucinas anti-inflamatória IL-10 e IL-Ra (CHRISTOFFERSEN et al., 2012; WOODWARD et al., 2015).

Apesar de todas as vantagens citadas acima, o uso dos AIES deve ser feito com cautela por apresentarem efeitos colaterais indesejáveis como a imunossupressão e até levar a um quadro de laminite (DELL'AQUA Jr. et al., 2006).

2.6.2. Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína que pode ser encontrada no sêmen, saliva e no leite (BUCKETT, 1997) e possui afinidade por moléculas de ferro e por lipopolissacarídeos de bactérias gram negativas possuindo ação bactericida e/ou bacteriostática (SUZUKI et al., 2005). A lactoferrina também possui ação

imunomoduladora, ativa o sistema imune e controla a mielopoiese (SUZUKI et al., 2005; BROCK, 2002). A lactoferrina se apresenta em maior quantidade durante o estro e quando ocorrem processos inflamatórios uterinos (KOLM et al., 2006).

Sua concentração normal em ejaculados de garanhões é de 150 µg/mL, porém, é correlacionada à baixa congelabilidade assim como à oligospermia no homem (JOBIM et al, 2011). A utilização de lactoferrina junto ao sêmen reduziu a expressão endometrial de interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-8, mas não foi capaz de reduzir o fluido intrauterino nem porcentagem de células de defesa 24h pós IA em éguas (COUTINHO DA SILVA et al., 2017).

Troedsson (2014), em um estudo *in vitro* observou que essa proteína, em concentrações próximas a encontrada no ejaculado, estimula a ligação de PMNs a espermatozoides mortos. Com isso, podemos deduzir que a fagocitose de espermatozoides não viáveis na presença da lactoferrina poderia auxiliar na limpeza uterina em éguas (FEDORKA et al., 2016).

Kolm (2006), constatou uma maior transcrição de lactoferrina no endométrio de éguas susceptíveis a EPPC quando comparada as éguas resistentes, uma vez que éguas susceptíveis possuem um maior influxo de PMNs durante a reação inflamatória e consequente liberação de lactoferrina dos grânulos dessas células. A lactoferina é capaz de suprir a expressão de mRNA de IL-1Ra, uma citocina anti-inflamatoria, o que demonstra uma possível propriedade imunomoduladora da resposta inflamatória dessa proteína além de constatar que essa proteína é capaz de modular a atividade dos PMNs e a eliminação deles do lúmen uterino (FEDORKA et al., 2016).

2.6.3. Plasma Rico em Plaquetas – PRP

O PRP pode ser de fonte autóloga ou heteróloga, de fácil aquisição e de baixo custo contendo muitos fatores de crescimento importantes para o processo de reparação tecidual. Para ter eficácia, o PRP deve conter entre três a cinco vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos (REGHINI, 2013).

O plasma rico em plaquetas é outro imunomodulador que se mostrou bastante eficiente no tratamento de éguas com endometrite, tendo efeito na

redução de acúmulo de fluido uterino e também diminui o influxo de PMNs para o lúmen uterino (REGHINI et al., 2016).

O PRP tem ação através da liberação de fatores de crescimento que são armazenados nos grânulos- α das plaquetas (TEXTOR et al., 2011). Os fatores de crescimento, quando liberados pelas plaquetas são ativados no tecido inflamado e são importantes no processo de reparação tecidual devido aos seus efeitos mitogênicos, anti-inflamatórios, quimiotáticos e neovasculares (MAZZOCCA et al., 2013; GONSHOR, 2002). O PRP também reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) e da iNOS (METCALF, 2014), se mostrando muito benéfico no incremento da fertilidade em éguas problema (SEGABINAZZI et al., 2017; METCALF, 2014). O PRP reduziu a infiltração de PMNs no lúmen uterino, além de reduzir a expressão de COX-2 das éguas suscetíveis após a inseminação artificial, tendo melhores resultados no tratamento pré do que na pós- inseminação (SEGABINAZZI et al., 2017).

A produção de lipoxinas a partir das plaquetas é como estas lipoxinas são as responsáveis pela modulação do processo inflamatório devido à diminuição da quimioatração dos monócitos para a lesão, os quais se transformam em macrófagos e realizam a cicatrização e resolução do processo inflamatório (REGHINI, 2013).

Além de sintetizar as lipoxinas, o PRP possui capacidade de aumentar os fatores de crescimentos para as áreas lesionadas, aumentam também os níveis de lipoxina A4 (LXA4) e de RANTES (EL-SHARKAWY et al., 2007). As LXA4 atuam na modulação da reação inflamatória, diminuindo a quimioatração de neutrófilos e os RANTES, uma quimiocina expressa nas células T e também nos α -grânulos plaquetários (HOLME et al., 1998) e que inibem a liberação de histamina pelos basófilos, inibindo o processo inflamatório em geral (REGHINI, 2013).

Infundir PRP no útero de éguas tem como principal objetivo favorecer o processo de fagocitose de bactérias e outros microrganismos através do complemento de opsoninas (fator de complemento). Uma ressalva muito importante para o sucesso desta terapia é que exista uma funcionalidade de contração miometrial e uma capacidade auto-limpante uterina (LIU, 2008).

Reghini et al. (2013) em um estudo em que compararam a inflamação de éguas resistente e suscetíveis a endometrite pela presença de PMNs do fluido

uterino e também pela quantidade e concentração de óxido nítrico. O trabalho concluiu que houve uma diminuição do fluido acumulado, uma diminuição do percentual de neutrófilos nas éguas suscetíveis considerados aceitáveis 24 horas pós-inseminação após o tratamento com plasma sanguíneo, o que sugere potencial terapêutico do plasma sanguíneo.

Ao se adicionar PRP homólogo no tratamento de infusão de antibióticos de 36 a 48 horas pós-inseminação promovendo uma melhora nas taxas de prenhez das éguas tratadas, quando compararam com as que receberam apenas antibioticoterapia, os autores sugeriram que essa melhora esta atribuída a uma fagocitose mais eficiente pelos neutrófilos, associados pelos componentes do sistema complemento e imunoglobulinas que também estão presentes no PRP (Pascoe et al., 1995).

2.6.4. Células Tronco Mesenquimais - CTMs

Células tronco são células indiferenciadas, sem função específica, com capacidade de multiplicar-se e de se manterem indiferenciadas por longos períodos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Mediante estímulos específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais de tecidos. Possuem uma capacidade de divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo em que dão origem a células precursoras com capacidade de diferenciação a um determinado tecido, também produzem células indiferenciadas que irão repor a população de células tronco (REYLES et al., 2001).

As células tronco possuem alto potencial terapêutico por possuírem capacidade imunomoduladora, promovem regeneração tecidual e previnem a formação de cicatrizes (BORJESSON, 2011). Possuem alta capacidade de plasticidade, ou seja, habilidade de diferenciação celular com fenótipo não relacionado a seu tecido de origem (BIANCO, 2001).

As células tronco embrionárias (CTE), retiradas da massa celular interna de embriões em fase inicial, são capazes de se diferenciar em qualquer tipo de tecido. As células tronco somáticas ou adultas (CTA), provenientes de tecidos diferenciados de fetos, recém-nascidos ou adultos, possuem papel de reparação tecidual (LANDIM-ALVARENGA et al., 2012).

Células tronco mesenquimais (CTMs) são células do grupo das CTA e tem sido foco de muitos estudos, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, com o objetivo de modular a resposta inflamatória nos processos inflamatórios agudos e crônicos (TIMMERS et al., 2011; BARRACHINA et al., 2016). Secretam moléculas biotivas, como os compostos imunomoduladores (PGE₂, IL-10, IL-1Ra e iNOS) (Da SILVA MEIRELLES, 2009) e, desta forma, estas células podem ser utilizadas, tanto em tratamentos como preventivamente nas EPPC (FERRIS et al., 2014).

As CTMs liberam alguns fatores solúveis como: PGE₂, INF- γ , IL-4, IL-10, TGF- β e HGF que inibem a proliferação dos linfócitos B e T, inibem a diferenciação dos monócitos em células dendríticas maduras, induzem células T à expressão fenotípica de regulação e inibem também a proliferação e a citotoxicidade das células natural Killers, promovendo desta forma a modulação da resposta infamatória (DE SCHAUWER et al., 2014).

As CTMs, quando ativadas, possuem característica de migrar para áreas que estão lesionadas, inflamadas e até tumorais (CHEN et al., 2008). Ao chegarem nesses locais, assumem o papel de reparação tecidual. Este processo se dá através de interações de citocinas e quimiosinas que são secretadas por tecidos adjacentes e induzem a diferenciação dessas células nas mais diversas linhagens celulares (TAKAHASHI et al., 2007). A secreção dessas substâncias e de fatores de crescimentos pelas CTMs, possuem como resultado final o recrutamento de macrófagos e outras células endoteliais, melhorando a cicatrização do local afetado (CHEN et al., 2008).

Células tronco mesenquimais têm sido foco de muitos estudos na medicina regenerativa de equinos, com foco em reparação de lesões tendíneas. Atuam nos processos de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual. Promovem o aumento do número de células progenitoras que estão presentes no tecido afetado, aumentando seu potencial de regeneração (YAMADA et al., 2011; FORTIER e TRAVIS, 2011).

Na medicina regenerativa, o processo cicatricial se dar pelo fornecimento de elementos celulares requisitados durante o processo, que garante a geração de novas células. Também é necessária uma produção de matriz extracelular para organizar plenamente a função dos novos tecidos gerados e sua integração sistêmica (LEVENBERG et al., 2003).

Pesquisas *in vivo* têm sugerido que CTMs melhoram a cicatrização tendínea em modelos de tendinite induzidas por colagenase (YAMADA et al, 2011, SCHNABEL et al., 2009; CARVALHO, 2009). Em um estudo realizado por Barreira (2005), avaliaram-se os efeitos de CTMs autólogas de medula óssea na cicatrização tendínea e comparados com grupo controle, foram encontrados alguns resultados como: aumento do infiltrado inflamatório celular, abundância de matriz, diminuição da necrose, pequeno aumento no índice de proliferação celular (Ki-67, clone M1B1) e uma menor imunomarcagem do TGF- β 1 que caracterizam uma aceleração no reparo do tendão no grupo tratado. O melhor momento para implantar as células é após a fase inflamatória e antes da fase da formação de tecido fibroso (CARVALHO et al. 2011; FORTIER & SMITH, 2007).

As CTMs possuem alto potencial para o tratamento de endometriose devido as suas propriedades terapêuticas. Para que a terapia tenha uma boa resposta terapêutica, precisa-se fazer a aplicação correta das células no lúmen uterino, garantindo assim uma ampla distribuição e deposição por todo tecido lesionado (STEINERT, 2012).

Rick et al. (2018), demonstraram propriedades imunomoduladoras de CTMs autólogas que foram infundidas em diestro e após 2 semanas foram feitas biópsias. Observou-se também uma ação no lúmen uterino por um período de até 24 horas pós-infusão, no qual o CTMs não penetrou no endotélio uterino saudável.

Ferris et al. (2014) em um experimento onde compararam o tratamento com células tronco 24 horas pré-inseminação e outros tratamentos considerados imunomoduladores, utilizou-se 2 mL de espermatozoides mortos para promover uma reação inflamatória. Foram coletados materiais antes do tratamento, 6 e 24 horas após o desafio para avaliar a reação inflamatória gerada. Observou-se uma redução de 50% no número de neutrófilos nas primeiras 6 horas e foi associado ao aumento na concentração de IL-1Ra, nas éguas tratadas. Houve também uma redução na concentração de IL-1 no momento 24 horas, sugerindo que o período de inflamação para estas éguas foi mais curto, comprovando a eficiência do tratamento com células tronco mesenquimais nas EPPC.

Alvarenga et al. (2016), realizaram um estudo com sucessivas injeções de 0,5 mL de células tronco (12×10^6 células em PBS) no endométrio

em uma linha horizontal, com distância de 1 cm entre as aplicações, indo de uma extremidade do corno a outra no período de diestro. Foram feitas coletas de biópsias nos dias 0, 15, 30 e 60. Em todas as coletas foram observadas infiltrados inflamatórios, no entanto, nenhuma égua demonstrou uma piora na estrutura do endométrio, demonstrando que esta técnica não causa nenhuma injúria ao endométrio.

Em um experimento, foi realizada infusão de células tronco em seis éguas com endometriose e como controle, um tratamento placebo. Foram realizadas biópsias uterinas por histopatologia. Sete dias após a infusão, as fêmeas que foram tratadas já mostraram uma organização tecidual e morfológica das glândulas uterinas, que foram confirmadas com as amostras coletadas nos dias 21 e 61. Para os animais não tratados não houve melhora significativa nos referidos parâmetros (MAMBELLI et al., 2013).

Pavão (2013) em um experimento com 10 éguas, administrou em cada corno uterino 10 mL contendo 2×10^7 células tronco mesenquimais. Foram realizadas biópsias uterinas nas horas 0, 15, 30 e 60 após aplicação da terapia, e revelou uma diminuição de 70,98% da fibrose endometrial entre as horas 0 e 60 pós tratamento.

2.6.5. Meio Condicionado por Células Tronco – MC

O meio condicionado é um meio utilizado para cultivar as células tronco, sendo descartado posteriormente ao crescimento e retirada das células. É classificado como um subproduto, mas contém metabólitos, fatores de crescimento, fatores pré e pró-inflamatórios e proteínas da matriz extracelular que são secretadas pelas células que foram cultivadas (FRESHNEY, 2005).

Em um estudo *in vitro* Bussche et al. (2014) identificaram fatores estimulantes angiogênicos no meio condicionado de CTMs de equinos, no qual teve uma indução da proliferação e uma formação das células endoteliais das células cultivadas. O MC obtido a partir do cultivo de CTMs contém todos os fatores que são secretados pelas CTMs e que podem ser utilizados como uma terapia regenerativa livre de células (MAGUIRE, 2013; HAARER et al., 2015).

As CTMs presentes no MC secretam citocinas tanto as anti-inflamatórias (TGF- β , IL-1Ra, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 e IL-27) como as pró-inflamatórias (IL-1, IL-8 / CXCL- 8 e IL-9) (PAWITAN, 2014; TONGU, 2019).

Ao utilizarem MC de CTMs obtidas a partir de membrana amniótica para o tratamento de lesões de ligamentos e tendões de cavalos atletas, Lange-Consiglio et al. (2013), observaram um efeito anti-inflamatório e uma capacidade de reorganização tecidual após a aplicação do MC nas lesões.

Já é de conhecimento que o meio condicionado possui microvesículas que são responsáveis por agir na reparação de tecidos e também atuam sobre o controle do stress oxidativo, estando desta forma agindo na imunomodulação e na regeneração do endométrio (MAIA et al., 2017; SHEN et al., 2015). O MC também apresentou bons resultados quando foi usado como adjuvante na criopreservação de células tronco mesenquimais de cordão umbilical de potros, mantendo as características biológicas destas células mesmo após o descongelamento. Estes resultados provavelmente estão atrelados à modulação do stress oxidativo, que diminuem as lesões de membrana e garantem uma maior viabilidade celular (MAIA et al., 2017).

Cho et al. (2017), utilizaram o MC no tratamento de doenças musculares associadas a inflamação crônica e liberação de citocinas pró-inflamatórias em humanos obesos. Os resultados mostraram efeitos positivos, melhorando a ativação de fibroblastos e diminuindo a inflamação por meio do bloqueio da atividade da IL-1 por meio da IL-1Ra. Concluíram que o MC pode ser uma terapia promissora no combate da inflamação associada à inatividade muscular.

Em um estudo utilizando MC para tratar cavalos com lesões ligamentares e tendíneas, foi observado um bom resultado, tanto na recuperação tecidual, como uma diminuição na inflamação no local da lesão pós-tratamento (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013).

O uso do meio condicionado, por não ser uma suspensão de células, possui algumas vantagens quando comparadas as células tronco. O MC tem as vantagens de poder ser fabricado, liofilizado, embalado e transportado com muita facilidade, além de não haver rejeições por parte do um possível receptor (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; PAWITAN, 2014; NUGROHO et al., 2016). O MC se mostra como uma alternativa promissora e inovadora para ser utilizado

na reprodução equina, já que se mostra de fácil manipulação e armazenamento, facilitando seu uso a campo (TONGU, 2019).

Em um estudo *in vitro* CORRADETTI et al., (2014) utilizaram células tronco mesenquimais de membrana amnióticas e o meio condicionado para tratar doenças uterinas em éguas. Houve uma melhora significativa na capacidade imunomodulatória, regenerativa e proliferativa endometrial, levando a uma diminuição na perda gestacional devido à fibrose endometrial.

Ho et al. (2017), utilizaram em um estudo, células tronco mesenquimais de medula óssea de humanos e também o MC, em feridas induzidas no útero de ratas. Demonstraram que não houve diferença estatística entre usar células tronco mesenquimais e MC na reparação tecidual, além de demonstrar a possibilidade do uso de MC heterólogo.

Em um experimento em que se adicionou MC junto ao sêmen diluído em várias concentrações, não foram observadas diferenças nos parâmetros cinéticos entre os grupos testados assim, como, também não houve alterações no parâmetro integridade de membrana plasmática, garantindo desta forma que o MC pode ser adicionado junto ao sêmen não comprometendo a viabilidade espermática (TONGU, 2019).

Tongu (2019), ao estudar o efeito do MC entre éguas resistentes e susceptíveis a EPPC, observou uma diminuição na porcentagem de PMNs 6 horas após a IA nas éguas resistentes quando comparada ao grupo controle. Não houve diferenças entre estes dois grupos nos momentos 0 e 24 horas e também não houve diferença na fertilidade entre os grupos. Para as éguas susceptíveis o grupo controle manteve altas concentrações de PMNs nos momentos 6 e 24 horas pós-inseminação artificial, no grupo tratado com MC houve uma redução significativa na porcentagem de PMNs nos momentos 6 e 24 horas. O MC também foi capaz de diminuir o acúmulo de fluido uterino nas éguas susceptíveis no momento 24 horas, demonstrando desta forma que o MC foi capaz de modular a resposta inflamatória diminuindo, assim, as porcentagens de PMNs, tanto nas éguas resistentes, como nas susceptíveis sendo sua utilização eficaz para o tratamento de EPPC.

Em virtude dos estudos apresentados, o uso do MC como um modulador da reação inflamatória pode vir a ser uma terapia promissora para minimizar os efeitos da EPPC em éguas susceptíveis.

3. REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p. 445-454, 1987.

AHMADI M.; RAHBARGHAZI R.; ASLANI M.R.; SHAHBAZFAR A.A.; KAZEMI M.; KEYHANMANESH R. Bone marrow mesenchymal stem cells and their conditioned media could potentially ameliorate ovalbumin-induced asthmatic changes. **Biomed Pharmacother** 2017; 85:28–40. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.127>.

ALBIHN, A.; BÅVERUD, V.; MAGNUSSON, U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. **Acta Vet. Scand.** 2003, 44, 121–129.

ALGHAMDI, A.S., TROEDSSON, M.H.T. Concentration of nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant of chronic post-breeding endometritis. **Theriogenology**, v.58, p. 445-448, 2002.

ALGHAMDI, A.S., FOSTER, D.N., TROEDSSON, M.H.T. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**, v127, p.593-600, 2004.

ALGHAMDI, A. S.; FOSTER, D. N.; CARLSON, C. S.; TROEDSSON, M. H. T. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression. In uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. **American journal of reproductive Immunology**, v.53, p. 230-237, 2005.

ALVARENGA, M. A., IWANA DE MATTOS, M.C. Utilização da escova ginecológica cytobrush na coleta de material endometrial de éguas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.42, p.67-8, 1990.

ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T. Biotecnologias em reprodução equina: o que há de novo para o veterinário de campo? **Braz. J. Equine Med.**, v. 26, p. 4-8, 2009.

ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; SEGABINAZZI, L. G.; GUASTALI, M. D.; MAIA, L.; LANDIM- ALVARENGA, F. C. Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares. **J. Equine Vet. Sci.** [Internet]. 2016; 42:12–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.002>

ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y.; SUMIYOSHI, K.; HODOHARA, K.; OKABE, H.; OCHI, Y.; BAMBA, T.; BROWN, W. R. Modulation of complement C3, C4 and factor B production in human intestinal epithelial cells: differential effects of TNF-, IFN- γ and IL-4. **Pathophysiology**, v. 2, p. 251-259, 1995.

ÄNGGÅRD, E. E. Endogenous and exogenous nitrates. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. V. 36, p. 7-10, 1992.

ANWAR, H.; STRAP, J.L.; COSTERTON, W. Establishment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1992, 36, 1347–1351.

ASBURY, A.C.; HALLIWELL, R.E.; FOSTER, G.W.; LONGINO, S.J. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. **Theriogenology**, v.14, p.299-308, 1980.

ASBURY, A. C. Endometritis in the mare. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 718-722, 1986.

ASBURY, A.C. Failure of uterine defense mechanisms. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 508-511, 1987.

BAIN, A.M. The role of infection in infertility in the thoroughbred mare. **Vet. Rec.** 1966, 78, 168–173.

BALL, B.A., SHIN, S.J., PATTEN, V.H., LEIN, D.H. & WOODS, G.L. Use of a lowvolume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. **Theriogenology**, v. 29, p. 1269-1283, 1988.

BARRACHINA, L.; REMACHA, A.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, F.; ALBAREDA, J.; PRADES, M, et al. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. **Vet Immunol Immunopathol** [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 10]; 171:57–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.007>

BARREIRA, A.; ALVES, A. L. G. **Implante Autólogo de Células Mesenquimais no Tratamento da Tendinite Induzida em Equinos; Avaliação Clínica, ultrassonografia e Imunohistoquímica**. 2005, p. 98. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BEEHAN, D.P.; WOLFSDORF, K.; ELAM, J.; KREKELER, N.; PACCAMONTI, D.; LYLE, S.K. The evaluation of biofilm-forming potential of escherichia coli collected from the equine female reproductive tract. **J. Equine Vet. Sci.** 2015, 35, 935–939.

BELTAIRE, K.A.; CHEONG, S.H.; COUTINHO DA SILVA, M.A. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999–2011). **Equine Vet. J. Suppl.** 2012, 84–87.

BERGER, D.; RAKHAMIMOVA, A.; POLLACK, A.; LOEWY, Z. Oral biofilms: Development, control, and analysis. **High Throughput**. 2018, 7, E24.

BERLOT, G.; BACER, B.; PIVA, M.; LUCANGELO, U.; VIVIANI, M. Immunoglobulins in Sepsis. **Advances in Sepsis**, v. 6, n. 2, p. 41-46, 2007.

BIANCO, P.; *et al.* Bone marrow stromal stem cells: Nature, Biology, and Potential Applications. **Stem Cells**. v. 19. n. 3. p.180-192. 2001.

BIELANSKI, W.; RZASA, J.; OKOLSKI, A. Prostaglandins in stallion semen. **Theriogenology**, v.17, n.2, p.167-173, 1982.

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

BOSSCHER, K. D.; BERGHE, W. V.; HAEGEMAN, G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, p. 16-22, 2000.

BOWDISH, D.M.E.; DAVIDSON, D.; HANCOCK, R.E.W. A re-evaluation of the Role of Host Defense Peptides in Mammalian Immunity. **Current Protein and Peptide Science**, v.6, p. 35-51, 2005.

BRENDEMUEHL, J. P. Effect of Oxytocin and PGF 2 α on luteal formation, function, and pregnancy rates in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 623-626, 2002.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rates in mares. **Theriogenology**, v. 35, p. 1111-1119, 1991.

BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.** v.68, n.49, p. 363-5, 2003.

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D. Endometritis in mares. **Large Anim. Vet. Rounds**, v. 3, n. 3, 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/213858523_Endometritis_in_mares> . Acesso em: 29 nov. 2015.

BROCK, J. H. The physiology of lactoferrin. **Biochem Cell Biol.** 2002; 80(1):1–6.

BROGDEN, K.A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat. Rev. Microbiol.** v.3, n.3, p. 238-50, 2005.

BROWN, K.L. & HANCOCK, R.E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Curr. Opin. Immunol.** v.18, n.1, p. 24-30, 2006.

BROWN, M.R.W.; ALLISON, D.G.; GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? **J. Antimicrob. Chemother.** 1988, 22, 777-780.

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

BUCKETT, W. M.; et al. Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. **Journal of Andrology**. v. 18. p. 302-304. 1997.

BUHIMSCHI, MD, CHANDRASEKHAR YALLAMPALLI, DVM, PHD, YUAN-LIN DONG, MD, PHD, AND ROBERT E. GARFIELD, PHD. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. [American Journal of Obstetrics and Gynecology](#), v. 172, p. 1577- 1584, 1995.

BULBUL, A.; YAGCI, A.; ALTUNBAS, K.; SEVIMLI, A.; CELIK, H.A.; KARADENIZ, A., AKDAG, E. 2007. The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rat. **Theriogenology**. 68, 1156-1168.

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

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

CADARIO, M. E.; THATCHER, W. W.; KLAPSTEIN, E.; MERRIT, A. M.; ARCHBALD, L. F.; THATCHER, M. J.; LEBLANC M. M. Dynamics of prostaglandin secretion, intrauterine fluid and uterine clearance in reproductively normal mares and mares with delayed uterine clearance. **Theriogenology**, v. 52, p. 1181-1192, 1999.

CAMPBELL, M. H. L.; ENGLAND, G. C. W. A comparison of the ecboic efficacy of intravenous and intrauterine oxytocin treatments. **Theriogenology**, v. 58, p. 437- 477, 2002.

CAMPBELL, M.H.L.; ENGLAND, G.C.W. The effect of coitus and artificial insemination of different volumes of fresh semen on uterine contractions in the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, v.94, p. 248-251, 2006.

CANISSO, I. F.; STEWART, J.; COUTINHO DA SILVA, M. A. Endometritis. **Vet Clin North Am Equine Pract** [Internet]. 2016; 32(3): 465–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749073916300438>

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

CARNEVALE, E. M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v. 69, p. 23-30, 2008.

CARVALHO, M.H.C.; COLACO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, Disfuncao Endotelial e Resistencia a Insulina. **Arq. Bras. Endoc. Metab.** v.50, p.304-312, 2006.

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

CARVALHO, A. M. **Implante autólogo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no tratamento de tendinites experimentais em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.** 2009. 134f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP

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

CHAPWANYA, A.; MEADE, K.G.; DOHERTY, M.L.; CALLANAN, J.J.; MEE, J.F.; O'FARRELY, C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v.71, p. 1396-1407, 2009.

CHEN, M.; MOHAMED, R. D.; KALLENBERG, C. G. M. The complement system in systemic autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, p. 276-286, 2010.

CHEN, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam. v. 40. n.5. p. 815-820. Jan. 2008.

CHEW, S.C.; KUNDUKAD, B.; SEVIOUR, T.; VAN DER MAAREL, J.R.C.; YANG, L.; RICE, S.A.; DOYLE, P.; KJELLEBERG, S. Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides. **mBio**. 2014, 5, 1–11.

Cho K-A, Park M, Kim Y-H, Woo S-Y, Ryu K-H. Conditioned media from human palatine tonsil mesenchymal stem cells regulates the interaction between myotubes and fibroblasts by IL-1Ra activity. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2019 Mar 10];21(1):130–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.12947>

CHRISTOFFERSEN, M.; WOODWARD, E. M.; BOJESSEN, A.M.; PETERSEN, M. R.; SQUIRES, E. L.; LEHN-JENSEN, H.; TROEDSSON, M. H. T. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**. 2012; 78:991–1004.

COLLINS, T.; CONTRAN, R.S.; KUMAR, V. Robbins Pathologic Basic of Disease. 6° ed., Ed WB Saunders, 1999.

COLLINS, S. A study of the incidence of cervical and uterine infection in Thoroughbred mares in Ireland. **Vet. Rec**. 1964, 66, 673–676.

CORRADETTI, B.; CORREANI, A.; ROMALDINI, A.; MARINI, M. G.; BIZZARO, D.; PERRINI, C. et al. Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Cells and Their Conditioned Media: Potential Candidates for Uterine Regenerative Therapy in the Horse. Asselin E, editor. **PLoS One** [Internet]. 2014 Oct 31 [cited 2019 Mar 10];9(10):e111324. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111324>

COUTINHO DA SILVA, M. A.; DARR, C. R.; MORAES, L. E.; FORSHEY, B. S. Lactoferrin Modulates Uterine Inflammation Postbreeding in the Mare. **J. Equine Vet. Sci.** [Internet]. 2017; 56:63–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.007>

DASCANIO, J.J. External reproductive anatomy. *In*: McKinnon A.O., et al., editors. **Equine reproduction**. 2nd ed. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2011. cap. 164. p. 1577–81.

DASCANIO, J.J.; SCHWEIZER, C.; LEY, W.B. Equine fungal endometritis. **Equine Vet. Educ**. 2010, 13, 324–329.

DELL'AQUA Jr. J. A. **Efeito da córtico-terapia e plasma seminal na resposta inflamatória e fertilidade de éguas submetidas à inseminação artificial**. Botucatu, 2004. 101p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

DELL' AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MACEDO, L. P.; MELO, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Anim. Reprod. Sci.** 2006; 94: 270–3.

DE SCHAUWER C, GOOSSENS K, PIEPERS S, HOOGEWIJS MK, GOVAERE JL, SMITS K, MEYER E, VAN SOOM A, VAN DE WALLE GR. (2014). Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. **Stem Cell Res Ther.** 5, 6. doi: 10.1186/scrt395

DINARELLO, C. A. Proinflammatory Cytokines. *Chest*, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

EKERHOVD, E.; BRÄNNSTRÖM, M.; WEIJDEGÄRD, B.; NORSTRÖM, A. Nitric oxide synthases in the human cervix at term pregnancy and effects of nitric oxide on cervical smooth muscle contractility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 83, n. 3, p. 610-616, 2000.

EL-SHARKAWY, H.; KANTARCI, A.; DEADY, J.; HASTURK, H.; LIU, H.; ALSHAHAT, M.; VAN DYKE, T. E. Platelet-rich plasma: growth factors and anti-inflammatory properties. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 661-669, 2007.

FERREIRO, L.; FERREIRO, C. L. R.; MATTOS, R. C.; FLORES, W. N.; PANSARD, H. S.; OLIVEIRA, L. M. S. Flora microbiana do conteúdo uterino de éguas PSI e quarto de milha a partir de swabs cervicais obtidos no período de 1984-1986 em haras do RS, PR e SP. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 14, p. 45-56, 1986.

FERRIS, R.A.; MCCUE, P.M.; BORLEE, G.I.; GLAPA, K.E.; MARTIN, K.H.; MANGALEA, M.R.; HENNET, M.L.; WOLFE, L.M.; BROECKLING, C.D.; BORLEE, B.R. Model of chronic equine endometritis involving a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Infect. Immun.** 2017, 85, e00332-17.

FERRIS, R.A. Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** 2017, 41, 74–80.

FERRIS, R.A.; MCCUE, P.M.; BORLEE, G.I.; LONCAR, K.D.; HENNET, M.L.; BORLEE, B.R. In vitro efficacy of nonantibiotic treatments on biofilm disruption of gram-negative pathogens and an in vivo model of infectious endometritis utilizing isolates from the equine uterus. **J. Clin. Microbiol.** 2016, 54, 631–639.

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

FERRIS, R.A.; WITTSTOCK, S.M.; MCCUE, P.M.; BORLEE, B.R. Evaluation of biofilms in gram-negative bacteria isolated from the equine uterus. **J. Equine Vet. Sci.** 2014, 34, 121.

FERRIS, R.A.; FRISBIE, D.D.; MCCUE, P.M. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. **Theriogenology**, Los Altos. v. 82. p. 36-42. Jan. 2014.

FERRIS, R.A. Bacterial endometritis: A focus on biofilms. **Clin. Theriogenol.** 2014, 6, 315–319.

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A.; MATTOS, A.L.G.; AMARAL, M.G.; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Sperm transport and uterine inflammatory response after insemination in the mare. **In: 15th International Congress on Animal Reproduction.** v.2, p.388, 2004.

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A.; MATTOS, A.L.; GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology.** v.67, p.556-62, 2007.

FIORATTI, E. G.; VILLAVERDE, A. I. S. B.; MELO, C. M.; TSUNEMI, M. H.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Influence of steroidal anti-inflammatory drugs on viability and fertility of equine semen. **J. Equine Vet. Sci.** 2012; 32: 771–5.

FIORATTI, E.G. **Efeito dos anti-inflamatorios esteroides na reação inflamatória e na fertilidade de éguas normais e susceptíveis a endometrite persistente apos inseminação artificial.** Botucatu, 2010. 141p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

FIORATTI E. G. **Estudo das catelicidinas no plasma seminal de garanhões e das interleucinas na resposta inflamatória pós-inseminação artificial em éguas.** Botucatu, 2013. 111p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

FORTIER, L.A, TRAVIS, A.J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Res Ther**, v.2, p.9, 2011.

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

FRISO, A. M.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; CYRINO, M.; CORREAL, S. B.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DO CARMO, M. T.; DELL'AQUA JR., J. A.; MIRÓ, J.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Periovulatory administration of firocoxib did

not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. **Theriogenology**, v. 138, p. 24-30, 2019.

FRISO, A. M. **Resposta inflamatória uterina de éguas com endometrite persistente pós-cobertura tratadas com firocoxib**. Botucatu, 2016. 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

FRONTOSO, R.; DE CARLO, E.; PASOLINI, M.P.; VAN DER MEULEN, K.; PAGNINI, U.; IOVANE, G.; DE MARTINO, L. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. **Res. Vet. Sci.** 2008, 84, 1–6.

FUMUSO, E.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.; BOWDEN, R. A. 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, p. 31-41, 2003.

FUMUSO, E.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; DAVID, O.; WADE, J.; ROGAN, D. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 282-285, 2006.

FUMUSO, E.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 30-39, 2007.

GALINDO, A.S.D.; KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA, B.D. Mecanismos de defesa uterinos na fêmea bovina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.9, n.30, p. 49-58, 2003.

GHAFOOR, A.; HAY, I.D.; REHM, B.H.A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **Appl. Environ. Microbiol.** 2011, 77, 5238–5246.

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

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, v.21, p.505-15, 1984.

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

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. **Int. J. Periodontics Restorative Dent** [Internet]. 2002 Dec [cited 2019 Mar 11]; 22(6):547–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516826>

GUTJAHR, S.; PACCAMONTI, D. L.; PYCOCK, J. F.; TAVERNE, M. A.; DIELEMAN, S. J.; VAN DER WEIJDEN, G. C. Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mares. **Theriogenology**, v.54, p. 447-456, 2000.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLDB, T. A.; KOOPMANS, S. J.; VAN DIJK, E.; MELOEND, R. H. Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**, v. 108, p. 229-232, 2006.

GUTJAHR, S.; PACCAMONT, D. L.; PYCOCK, J. F.; TAVERNE, M. A. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DER WEIJDEN, G. C. Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mare. **Theriogenology**. 2000; 54 (00): 3.

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

HANCOCK, R.E. & DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiol.** v.8, n.9, p. 402-10, 2000.

HAY, I.D.; REMMINGHORST, U.; REHM, B.H.A. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2009, 75, 1110–1120.

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

HICKMAN, J.W.; TIFREA, D.F.; HARWOOD, C.S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2005, 102, 14422–14427.

HINRICHS, K., CUMMINGS, M.R., SERTICH, P.L., KENNEY, R.M. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **J. Am. Vet. Med. Ass.** V.193, p.72-75, 1988.

Ho CH, Lan CW, Liao CY, Hung SC, Li HY, Sung YJ. Mesenchymal stem cells and their conditioned medium can enhance the repair of uterine defects in a rat model. *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2017;1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2017.03.013>

HOLME, P. A.; MULLER, F.; SOLUM, N. O.; BROSSTAD, F.; FROLAND, S. S.; AUKRUST, P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. **FASEB J.**, v. 12, p. 79-89, 1998.

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

[JABLONKA-SHARIFF, A. PHD](#), [RITA BASURAY PHD](#) & [LISA M. OLSON PHD](#). Inhibitors of Nitric Oxide Synthase Influence Oocyte Maturation in Rats. [The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI](#). V. 6, p. 95-101, 1999.

JENSSEN, H.; HAMILL, P., HANCOCK, R.E. Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.** v.19, n.3, p. 491-511, 2006.

JENSEN, E.T.; KHARAZMI, A.; LAM, K.; COSTERTON, J.W.; HØIBY, N. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. **Infect. Immun.** 1990, 58, 2383–2385.

JENNINGS, L.K.; STOREK, K.M.; LEDVINA, H.E.; COULON, C.; MARMONT, L.S.; SADOVSKAYA, I.; SECOR, P.R.; TSENG, B.S.; SCIAN, M.; FILLOUX, A.; et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2015, 112, 11353–11358.

JOBIM, M. I., et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v.76. p. 765-771. 2011.

JOHNSON P.J.; SLIGHT S.H.; GANJAM V.K.; KREEGER J.M. Glucocorticoids and laminitis in the horse. **Vet Clin North Am Equine Pract** 2002; 18:219–36. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00015-9).

JONES, S.A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J. Immunol.** v.175, p. 3463-8, 2005.

KATILA, T.; PORTUS, B.J.; REILAS, T. The effect of seminal plasma on uterine inflammation and contractility in mares. In: **15th International Congress on Animal Reproduction**, v.2, p.392, 2004.

KAVANAGH, K. & DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **J. Pharm. Pharmacol.** v.56, n.3, p. 285-9, 2004.

KNUTTI B., et al. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. **Equine Veterinary Education**, v.12. p.276-270. 2000.

KOLM, G.; KLEIN, D.; KNAPP, E.; WATANABE, K.; WALTER, I. Lactoferrin expression in the horse endometrium: Relevance in persisting mating-induced endometritis. **Vet. Immunol Immunopathol.** 2006; 114(1–2):159–67.

KOTILAIENN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v.41, p. 629-636, 1994.

KOO, J.C.; LEE B.; YOUNG, M.E.; KOO, S.C.; COOPER, J.A.; BAEK, D.; LIM, C.O.; LEE, S.Y.; YUN, D.J., CHO, M.J. Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. **Plant. Cell. Physiol.** v.45, n.11, p. 1669-80, 2004.

KRYCH, M.; ATKINSON, J. P.; HOLERS, V. M. Complement receptors. **Current Opinion in Immunology**, v.4, p. 8-13, 1992.

KUCHMA, S.L.; CONNOLLY, J.P.; O'TOOLE, G.A. Athree-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.** 2005, 187, 1441–1454.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P. D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novelsecond generation coxib, in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 208–217, 2007b.

LAI, Y. & GALLO, R.L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends Immunol.** v.30, n.3, p. 131-41, 2009.

LANDIM – ALVARENGA, F. C.; FERNANDES, C. B.; ALVARENGA, M. L. Terapia regenerativa com células madre mesenquimais em equinos. *In*: III Congresso Argentino de Reproducción Equina, 2012, Rio Cuarto. Resúmenes... Rio Cuarto: Luis Losinno, 2012, p. 231-242.

LANGE-CONSIGLIO, A.; ROSSI, D.; TASSAN, S.; PEREGO, R.; CREMONESI, F.; PAROLINI, O. Conditioned Medium from Horse Amniotic Membrane-Derived Multipotent Progenitor Cells: Immunomodulatory Activity In Vitro and First Clinical Application in Tendon and Ligament Injuries In Vivo. **Stem Cells Dev** [Internet]. 2013; 22 (22) :3015–24. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2013.0214>

LEBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, A. C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurements of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Vet. J.**, v. 26, p. 109-113, 1994.

LEBLANC, M. M.; JOHNSON, R. D.; CALDERWOOD, M. B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptibles to endometritis. **Biol. Reprod.**, n. 1, p. 501-506, 1995.

LEBLANC, M. M. The equine endometrium and the pathophysiology of endometritis. **Proc. Reprod. Pathol.**, p. 78-84, 1997.

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

LEBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; JONES, L.; CAGE, C.; MAURAGIS, D. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. **Theriogenology**, v. 50, p. 49-54, 1998.

LEBLANC, M. M. Persistent mating-induced endometritis. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 5.ed. St. Louis: Elsevier Science, 2003. p. 234-237.

LEBLANC, M.M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A.J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**. 2007, 68, 403–412.

LEBLANC, M. M. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. **Theriogenology**. 2008; 70(3): 421–9.

LEBLANC, M.; CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reprod. Domest. Anim.** 2009, 44, 10–22.

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

LETENDRE, L.; TESSMAN, R. K.; MCCLURE, S. R.; KVATERNICK, V. J.; FISCHER, J. B.; HANSON, P. D. Pharmacokinetics of firocoxib after administration of multiple consecutive daily doses to horses. **Am J Vet**, v. 11, p.1399–405, 2008.

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

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

LÖWENBERG, M.; STAHN, C.; HOMMES, D. W.; BUTTGEREIT, F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. **Steroids**. 2008; 73(9–10): 1025–9.

MA, L.; JACKSON, K.D.; LANDRY, R.M.; PARSEK, M.R.; WOZNIAK, D.J. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. **J. Bacteriol.** 2006, 188, 8213–8221.

MAIA L, DIAS MC, MORAES CN DE, AQUA CDPF, SILVEIRA LSL. Conditioned medium : a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. 2017;41:239–48.

MAH, T.F.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.** 2001, 9, 34–39.

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

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MATTOS, A. L. G.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Intrauterine fluid accumulation during foal heat increases embryonic death. **Pferdeheilkunde**, v. 19, p. 246-249, 2003a.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S. M.; JOBIM, M. I. M.; ESMERALDINO, A. M. T.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Avaliação do perfil proteico da secreção endometrial pura da égua através da eletroforese bi-dimensional: Efeito do ciclo. In: MALSCHITZKY, E. Artigo 1. Avaliação do perfil proteico da secreção endometrial da égua. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias). UFRGS, 2007a.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S. M.; ESMERALDINO, A. M. T.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. In: MALSCHITZKY, E. Artigo 3. Perfil proteico da secreção uterina de égua no primeiro e em diestro subsequente da temporada reprodutiva. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias). UFRGS, 2007b.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S. M.; ESMERALDINO, A. M. T.; NEVES, A. P.; GARBADE, P.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**, v.24, p. 74-78, 2008.

MAMBELLI, L.I.; WINTER, G.H.Z.; KERKIS, A.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS, R.C.; KERKIS, I. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. **Theriogenology**. 2013, 79, 744–750.

MAZZOCCA, A. D.; MCCARTHY, M. B. R.; INTRAVIA, J.; BEITZEL, K.; APOSTOLAKOS, J.; COTE, M. P, et al. An In Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Effects of Platelet-Rich Plasma, Ketorolac, and Methylprednisolone. **Arthrosc J. Arthrosc Relat. Surg.** [Internet]. 2013 Apr [cited 2019 Mar 11]; 29(4):675–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395471>

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

McDOWELL, K.J.; LITTLE, T.V.; TIMONEY, P.J.; ADAMS, M.H. Characterization of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and geldings supplemented with testosterone. **Journal of Veterinary Science**, v. 61, p.33-37, 1996.

MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L. & SHIDELER, R.K. Diagnostic ultrasonography of the mare's reproductive tract. **Eq. Vet. Sci.**, v. 8, p.329-333, 1988.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Advances in immunology: innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 337-344, 2000.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.

METCALF, E. S. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). **J. Equine Vet. Sci.** [Internet]. 2014; 34(1):128. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080613007211>

METTE, C.; DOOLEWEERDTA, B. C.; STINEB, J.; MIKI, B. A. ROENNA, P. M.; HENRIKA, L-J. 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, p. 95-105, 2010.

MERIGHI, M.; LEE, V.T.; HYODO, M.; HAYAKAWA, Y.; LORY, S. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.** 2007, 65, 876–895.

MITCHELL, G.; LIU, I.K.M.; PERRYMAN, L.E.; STABENFELDT, G.H.; HUGHES, J.P. Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium – a mucosal immune system. **J. Reprod. Fert. Suppl.** 32, p.161-68, 1982.

MOIRA, K.O.; ZINI, A.; CHENG, C.Y.; SCHLEGEL, P.N. 1998. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. **Fertil. Steril.** 70, 1143-1147.

MOOKHERJEE, N. & HANCOCK, R.E. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. **Cell. Mol. Life Sci.** v.64, n.7-8, p. 922-33, 2007.

MORSE, D.J.; WILSON, M.J.; WEI, X.; LEWIS, M.A.O.; BRADSHAW, D.J.; MURDOCH, C.; WILLIAMS, D.W. Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. **J. Med. Microbiol.** 2018, 67, 364–375.

MOSSER DM, ZHANG X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* [Internet]. 2008 Dec [cited 2019 Mar 11];226(1):205–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161426>

MUSTOE, T. Understanding chronic wounds: A unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. **Am. J. Surg.** 2004, 187, S65–S70.

NASH, D.M.; SHELDON, I.M.; HERATH, S.; LANE, E.A. Markers of the uterine innate immune response of the mare. **Animal Reproduction Science.** v.119, p.31–39, 2010b.

NIE, G. J.; JOHNSON, K. E.; WENZEL, J. G. W.; BRADEN, T. D. Luteal function in mares following administration of oxytocin, cloprostenol or saline on Day 0, 1 or 2 post-ovulation. *Theriogenology*. 2003; 60(6):1119–25.

NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H.; WATSON, E.D. 2000a. Oxytocin and PGF2 α release in mares resistant and susceptible to persistent mating-induced endometritis. **J. Reprod. Fertil.** (Suppl.) 56, 363–372.

NODA, M.; KARIURA, Y.; PANNASCH, U.; NISHIKAWA, K.; WANG, L.; SEIKE, T.; IFUKU, M.; KOSAI, Y.; WANG, B.; NOLTE, C.; AOKI, S.; KETTENMANN, H.; WADA, K. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 2, p. 397–410, 2007.

NUGROHO, W. S.; KUSINDARTA, D. L.; SUSETYA, H.; FITRIANA, I.; MULYANI, G. T.; FIBRIANTO, Y. H. et al. The structural and functional recovery of pancreatic β -cells in type 1 diabetes mellitus induced mesenchymal stem cell-conditioned medium. **Vet World.** 2016;9(5):535–9.

PACE, T. W. W.; HU, F.; MILLER, A. H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. **Brain, Behavior and Immunity**, v.21, p. 9-19, 2007.

PALM, F.; WALTER, I.; BUDIK, S.; AURICH, C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response of the endometrium in oestrus mares. **Anim. Reprod. Sci.**, v.94, p.286-289, 2006.

PALM, F.; WALTER, I.; BUDIK, S.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; AURICH, C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. **Theriogenology**, v. 70, p. 843-851, 2008.

PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; SOARES, Z. F.; LOPES, M. D. Use of corticosteroid therapy on the modulation of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen semen. **Pferdeheilkunde**. 2008; 24: 79-82.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PASCOE, D.R.; Effect of adding autologous plasma to an intrauterine antibiotic therapy after breeding on pregnancy rates in mares. **Biology of Reproduction**. Monograph series. v.1, p. 539-543. 1995.

PAWITAN, J. A. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. **Biomed Res Int** [Internet]. 2014 Aug 28 [cited 2019 Mar 10];2014:965849. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530971>

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

PEREIRA, H. M. G.; MARQUES, M. A. S.; CARDOSO, J. N.; AQUINO NETO, F. R. Analise de glicocorticosteroides por CG-EM: uma nova abordagem de derivatização para o controle de dopagem n esporte. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1096-1102, 2002.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. APPLication of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Reserch** v. 35, p. 163-187, 2004.

PORTUS, B.J.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of plasma seminal on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. **Equine Vet. J.**, v.37, n.6, 2005.

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

PYCOCK, J. F. Breeding management of the problem mare. In: SAMPER, J. C. (Ed.). **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: WB Saunders, 2000. p. 195-228.

RASCH, K.; SCHOON, H. A.; SIEME, H.; KLUG, E. Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rate in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, n. 6, p. 455-460, 1996.

RASMUSSEN, S.; LARSEN, A. S.; THOMSEN, S. T.; KEHLET, H. Intra-articular glucocorticoid, bupivacaine and morphine reduces pain, inflammatory response and convalescence after arthroscopic meniscectomy. *Pain*, v. 78, p. 131-134, 1998.

REGHINI F.M.; RAMIRES C.; SEGABINAZZI L.G.; MANOELA M.; CHAVES B.C.; PAULA C De, et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology** 2016; 86:516–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>.

REGHINI, M.F.S. **Efeito do tratamento com plasma rico em plaquetas em éguas resistentes e suscetíveis à endometrites persistente após inseminação natural**, 2013. 104f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2013.

REILAS, T.; KATILA, T.; MAKELA, O.; HUNTINEN, M.; KOSKINEN, E. Intrauterine fluid accumulation in oestrous mares. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 38, p. 69-78, 1997.

REILAS, T. **Uterine luminal environment of the mare**. Academic dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 391p, 2001.

REILAS, T.; RISCO, A. M.; KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Effect of flunixin meglumine and oxytocin on uterine response to insemination in mares. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 94, p. 252-253, 2006.

REITZENSTEIN, M.; CALLHAN, M. A.; HANSEN, P. J.; LEBLANC, M. M. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. **Theriogenology**, v. 58, p. 887-898, 2002.

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

RIGBY, S.L.; HILL, J.; MILLER, C.; THOMPSON, J.; VARNER, D.; BLANCHARD, T. Administration of oxytocin immediately after insemination does not improve pregnancy rates in mares bred by fertile or subfertile stallions. **Theriogenology**, v.51, p.1143-1150, 1999.

RIGBY, S. L.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R. C.; COLLERAN, P.; THOMPSON, J. A.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; BRINSKO, S. P.; TAYLOR, T.; WILKERSON, M. K.; Delp, M. D. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 740-747, 2001.

RINK, B. E.; BEYER, T.; FRENCH, H. M.; WATSON, E.; AURICH, C.; DONADEU, F. X. The Fate of Autologous Endometrial Mesenchymal Stromal Cells After Application in the Healthy Equine Uterus. **Stem Cells Dev.** [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2019 Mar 10]; 27(15):1046–52. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2018.0056>

RISCO, A. M.; REILAS, T.; MUILU, L.; KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Effect of oxytocin and flunixin meglumine on uterine response to insemination in mares. **Theriogenology** [Internet]. 2009 Dec [cited 2019 Mar 9]; 72(9):1195–201. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X09003574>

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: **Pathologic Basis of Disease**, 6^a ed, p. 32-58, 1999.

ROCHA, F, T. **Meio condicionado de células tronco mesenquimais como tratamento de endometrose em éguas**. Porto Alegre, 2018. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do sul.

RODEBERG, D. A.; CHAET, M. S.; BASS, R. C.; ARKOVITZ, M. S.; GARCIA, V. F. Nitric oxide: An overview. **The American Journal of Surgery**, v. 170, p. 292-303, 1995.

ROJER, H.; AURICH, C. Treatment of Persistent Mating-Induced Endometritis in Mares with the Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug Vedaprofen. **Reprod Domest Anim** [Internet]. 2010 Dec [cited 2019 Mar 9];45(6):e458–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2009.01572.x>

ROMLING, U.; GALPERIN, M.Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: The First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 2013, 77, 1–52.

SAXENA, D.; PUROHIT, S. B.; KUMAR, P. G.; LALORAYA, M. Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at

implantation. NITRIC OXIDE: **Biology and Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 384-391, 2000.

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

SEGABINAZZI, L. G. T. M. **Efeito do plasma rico em plaquetas pré ou pós-inseminação artificial sobre a resposta inflamatória e índice de fertilidade em éguas susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura**. Botucatu, 2016. 67p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

SEGABINAZZI, L. G.; FRISO, A. M.; CORREAL, S. B.; CRESPILO, A. M.; DELL’AQUA, J. A.; MIRÓ, J. et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. **Theriogenology** [Internet]. 2017; 104:120–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.007>

SHAH, D.; ZHANG, Z.; KHODURSKY, A.; KALDALU, N.; KURG, K.; LEWIS, K. Persisters: A distinct physiological state of E. coli. **BMC Microbiol.** 2006, 6, 53.

SHEN, C.; LIE, P.; MIAO, T.; YU, M.; LU, Q.; FENG, T. et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. **Mol Med Rep.** 2015;12(1):20–30.

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

SQUIRES, E.L. et al. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 192, p. 350-353, 1988.

STECKLER, D.; NAIDOO, V.; GERBER, D.; KÄHN, W. Ex vivo influence of carbetocin on equine myometrial muscles and comparison with oxytocin. **Theriogenology** [Internet]. 2012; 78 (3): 502–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.030>

STEINERT, A.F.; et al. **The clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives**. Revisão. **Stem Cell Trans Med**. v. 1. p. 237-247. 2012.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Ann. Rev. Microbiol.** 2002, 56, 187–209.

SUFFREDINI, A. F.; FANTUZZI, G.; BADOLATO, R.; OPPENHEIM, J. J.; O'GRADY, N. New insights into the biology of the acute phase response. **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, p. 203-214, 1999.

SUZUKI, Y. A.; LOPEZ, V.; LÖNNERDAL, B. Lactoferrin. **Cell Mol. Life Sci.** [Internet]. 2005 Nov 2 [cited 2019 Mar 10];62(22):2560–75. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5371-1>

TAKAHASHI, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, Cambridge. v. 131. n.5. p. 861-872. Nov. 2007.

TEXTOR, J. A.; NORRIS, J. W.; TABLIN, F. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. **Am J. Vet. Res.** [Internet]. 2011 Feb [cited 2019 Mar 11]; 72(2):271–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281204>

THURLOW, L.R.; HANKE, M.L.; FRITZ, T.; ANGLE, A.; ALDRICH, A.; WILLIAMS, S.H.; ENGEBRETSEN, I.L.; BAYLES, K.W.; HORSWILL, A.R.; KIELIAN, T. Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. **J. Immunol.** 2011, 186, 6585–6596.

TIMMERS, L.; LIM, S. K.; HOEFER, I. E.; ARSLAN, F.; LAI, R. C.; VAN OORSCHOT, A. A. M, *et al.* Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. **Stem Cell Res.** [Internet]. 2011 May 1 [cited 2019 Mar 10];6(3):206–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187350611100002X?via%253Dihub>

TIZARD, I.R. Resistência às bactérias. In: _____. *Imunologia veterinária*. 5.ed. São Paulo: Editora Roca, 1998. p.294-309.

TREBINO, C. E.; STOCK, J. L.; GIBBONS, C. P.; NAIMAN, B. M.; WACHTMANN, T. S.; UMLAND, J. P.; PANDHER, K.; LAPOINTE, J.-M.; SAHA, S.; ROACH, M. L.; CARTER, D.; THOMAS, N. A.; DURTSCHI, B. A.; MCNEISH, J. D.; HAMBOR, J. E.; JAKOBSSON, P.-J.; CARTY, T. J.; PEREZ, J. R.; AUDOLY, L. P. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 15, p. 9044–9, 2003.

TOMASINSIG, L.; ZANETTI, M. The Cathelicidins – Structure, Function and Evolution. **Current Protein and Peptide Science**, v.6, p. 23-34, 2005.

TOMILINSON, S. Complement defense mechanisms. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, p. 83-89, 1993.

TONGU, E. A. O. **Efeito da adição de meio condicionado por células tronco mesenquimais na viabilidade espermática e resposta inflamatória uterina pós inseminação artificial em equinos**. Botucatu, 2019. 41p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

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

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; ING, M.; PASCOE, J.; THURMOND, M. J. Multiple site electromyographic recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 307-313, 1993.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; ING, M.; PASCOE, J.; THURMOND M. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **J. Reprod. Fertil.** 99, 307-13, 1993b.

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

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; ING, M.; PASCOE, J. Smooth Muscle Electrical Activity in the Oviduct, and the Effect of Oxytocin, Prostaglandin F₂ α , and Prostaglandin E₂ on the Myometrium and the Oviduct of the Cycling Mare¹. Biol Reprod [Internet]. 1995 Jan 1 [cited 2019 Mar 9]; 52 (monograph_series1): 475–88. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/52/monographseries1/475/5050346>

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

TROEDSSON, M.H.T; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm transport and survival in the mare: a review. **Theriogenology**, v.50. p. 807-818, 1998.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, 1999; v.52 p.461–471. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00143-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00143-0).

TROEDSSON, M.H.T., LEE, C-S., FRANKLIN, R.D. & CRABO, B.G. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. **J. Reprod. Fert.** Supplement 56, p.341-349, 2000.

TROEDSSON, M. H. T.; ALGHAMDI, A. S.; MATTISEN, J. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology**, v. 58, p. 453-456, 2002.

TROEDSSON, M.H.T.; ALGHAMDI, A.S.; DESVOUSGES, A.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R., COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Anim. Reprod. Sci.** 89, 171-186.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; MACPHERSON, M.L., POZOR, M.P. 2008. Persistent breeding-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**. 24, 56-60.

TROEDSSON, M.H.T; *et al.* Equine seminal plasma derived lactoferrin regulates binding of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) to spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 34. p. 49. 2014.

TUNÓN, A-M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; HULTÉN, C.; NUMMIJILRVI, A.; MAGNUSSON, U. Concentrations of total protein, albumin and immunoglobulins in undiluted uterine fluid of gynecologically healthy mares. *Theriogenology*, v. 50, p. 821-831, 1998.

WALTER, J.; NEUBERG, K.P.; FAILING, K.; WEHREND, A. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. **Anim. Reprod. Sci.** 2012, 132, 178–186.

WATSON, E.D.; NIKOLAKOPOULOS, E.; GILBERT, C.; GOODE, J. Oxytocin in the semen and gonads of stallion. **Theriogenology**, v.51, p.855-865, 1999.

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

WELSH, R. D. The significance of *Streptococcus zooepidemicus* in the horse. **Equine Practice**, v. 6, p. 6-16, 1984.

WERDAN, K. Intravenous immunoglobulin for prophylaxis and therapy of sepsis. **Current Opinion in Critical Care**, v. 7, p. 354-361, 2001.

WIDDERS, P.R., STOKES, C.R., DAVID, J.S.E. & BOURNE, F.J. Quantitation of the immunoglobulins in reproductive tract secretions of the mare. **Res. Vet. Sci.**, v.37, p. 324-330, 1984.

WINGFIELD DIGBY, N.J.; RICKETTS, S.W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978–1981. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 1982, 32, 181–185.

WOLF, C. A. **Análise do líquido endometrial de éguas suscetíveis a endometrite: efeito da corticoterapia.** Porto Alegre, 2011. 150p. Tese

(Doutorado) – Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do sul.

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; HOROHOV, D.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. **Equine Vet. J.**, v. 47, p. 235-239, 2015.

YAMADA, A.L.M.; OLIVEIRA, P.G.G.; CARVALHO, A.M.; WATANABE, M.J.; HUSSNI, C.A.; ALVES, A.L.G.. Bone marrow mononuclear cells in the treatment of complete tear of flexor tendons and suspensory ligament in the horse. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.63 n.6, 2011

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 222, p. 1108-1119, 2003.

VASSEUR, P.; VALLET-GELY, I.; SOSCIA, C.; GENIN, S.; FILLOUX, A. The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. **Microbiology.** 2005, 151, 985–997.

VERONESI, M. C.; CARLUCCIO, A.; KINDAHL, H.; FAUSTINI, M.; BATTOCCHIO, M.; CAIROLI, F. Oxytocin-induced PGF2 α release in mares with and without post-breeding delayed uterine clearance. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med.* 2006;53(5):259–62.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M., LEI. X.F. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J. Clin. Invest.** v.101, p. 311-20, 1998.

ZAYED MN, SCHUMACHER J, MISK N, DHAR MS. Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid. **Vet. J.** [Internet]. 2016; 217:26–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023316300685>

ZENT, W.W.; TROEDSSON, M.H.T. Post breeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: A field study. In: *Proc. Am. Assoc. Eq. Practic.* 44, 64-65, 1998.

4. HIPÓTESE

Hipótese 1- A infusão intrauterina de MC promove uma melhora nos parâmetros clínicos (fluido uterino pós-cobertura, inflamação endometrial) pós-cobertura/IA de éguas susceptíveis a EPPC.

Hipótese 2 – O tratamento com MC aumenta a taxa de fertilidade de éguas susceptíveis a EPPC.

Hipótese 3- A terapia intrauterina com MC modula a resposta inflamatória no endométrio, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

5. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da infusão intrauterina de MC sobre os aspectos clínicos (acúmulo de fluido uterino, contagem de células inflamatórias), moleculares (citocinas pró- e anti-inflamatórias) e microbiológicos (crescimento e isolamento bacteriano), assim como as taxas de fertilidade em éguas susceptíveis a EPPC.

CAPITULO 2

ARTIGO 1

EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CELULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS- COBERTURA DE ÉGUAS SUSCEPTIVEIS A ENDOMETRITE

Artigo redigido nas normas da revista Animal Reproduction Science, ISSN 0378-4320, fator de impacto 1.660, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2019.

L. S. G. Brasileiro, M.A. Alvarenga

São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Sao Paulo, Brazil

1 **RESUMO**

2 A endometrite é uma inflamação do endométrio que pode ser causada por
3 agentes infecciosos e não infecciosos e é a enfermidade reprodutiva mais
4 comum nas éguas. Diante disso, terapias estão sendo estudados na modulação
5 da resposta inflamatória uterina. O presente experimento visou avaliar *in vivo*, a
6 capacidade imunomoduladora do MC no processo inflamatório do endométrio de
7 éguas susceptíveis pós-cobertura, assim como o seu efeito sobre a taxa de
8 fertilidade. Tanto no crescimento de bactérias como na recuperação embrionária,
9 os resultados foram similares entre os grupos controle e tratado. No entanto, foi
10 observada uma diminuição significativa na contagem de PMNs na citologia
11 uterina 6 e 24 horas pós-cobertura, no grupo tratado com MC ($p < 0,05$) quando
12 comparado ao grupo controle. No que diz respeito às interleucinas observamos
13 que para a IL-10 não houve diferenças entre os grupos controle e tratado ao
14 longo dos tempos. Porém, o grupo controle teve um aumento numérico após a
15 inseminação - fato que não ocorreu no grupo tratado. Para o TNF- α também não
16 houve diferenças entre os grupos, mas observou-se um decréscimo numérico
17 nos tempos 6 e 24 horas no grupo tratado. No que se refere a IL-6 foi observada
18 a diferença entre os grupos. No grupo controle houve diminuição nos tempos 6
19 e 24 horas em comparação ao tempo 0 hora - o que não ocorreu no grupo
20 tratado. Com isso, podemos concluir que o MC foi efetivo na modulação da
21 resposta inflamatória em éguas susceptíveis a EPPC.

22 **Palavras-chave:** Neutrófilos, interleucinas, inflamação, imunomodulador, útero

1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, logo após a cópula ou inseminação artificial, é desencadeada uma reação inflamatório fisiológica endometrial, provocada pela presença do sêmen (TROEDSSON et al., 1998). Devido às características anatômicas e reprodutivas da égua, a cérvix encontra-se relaxada durante o estro, o que possibilita que durante a cópula o macho deposite o sêmen no interior do útero durante a ejaculação (KOTILAINEN et al., 1994). Durante esse processo, além de espermatozoides e do plasma seminal, também são carregados debris celulares e microrganismos que podem agravar este quadro inflamatório (BRINSKO et al., 1991; TROEDSSON, 1999).

Por este motivo é que as endometrites são relativamente comuns nas éguas (TRAUB – DARGATZ et al., 1991). Tal enfermidade é o problema reprodutivo mais comum nessa espécie e a terceira afecção que mais acomete os equinos (TRAUB – DARGATZ et al., 1991; TROEDSSON, 1999), podendo causar muitos impactos econômicos no mercado do cavalo (GUTJAHR et al., 2001). A endometrite é uma inflamação/infecção do endométrio que pode ser causada por agentes infecciosos (bactérias e fungos) e não infecciosos (sêmen) (TROEDSSON et al., 1998).

As éguas são classificadas como resistentes ou susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura (EPPC). As susceptíveis são as que possuem dificuldade em debelar o processo inflamatório por um período de até 48 horas após a deposição do sêmen intrauterino. Enquanto isso, as éguas resistentes possuem essa capacidade, proporcionando um ambiente uterino adequado ao recebimento do embrião (BRITO & BARTH, 2003).

47 Nas éguas susceptíveis ocorre uma falha no processo de limpeza
48 uterina apresentando uma reação inflamatória exacerbada, associada a um
49 acúmulo de líquido no interior do útero (TROEDSSON, 1999). Isso pode se
50 agravar pelo fato de que este líquido serve como meio de cultura para agentes
51 oportunistas, podendo agravar o quadro da endometrite (LEBLANC, 2003) e,
52 consequentemente, promover um ambiente uterino totalmente desfavorável e
53 incompatível ao desenvolvimento embrionário (TROEDSSON, 1999; CARD,
54 2005).

55 Os tratamentos mais comumente utilizados para EPPC (drogas
56 ecbólicas e lavagem uterina) são considerados tratamentos de suporte, pois
57 auxiliam na limpeza e manutenção de um ambiente uterino adequado. No
58 entanto, estes tratamentos não atuam diretamente no processo inflamatório
59 (SEGABINAZZI, 2016). Desta forma alguns pesquisadores (FUMUSO et al.,
60 2003; DELL'AQUA Jr. et al., 2006; BUCCA et al., 2008; PAPA et al., 2008;
61 FIORATTI et al., 2013; REGHINI, 2013; METCALF, 2012; METCALF, 2014;
62 SEGABINAZZI et al., 2017), estudando alguns imunomoduladores, como
63 mediadores da resposta inflamatória, têm demonstrado uma redução na
64 inflamação uterina com um incremento nos índices de fertilidade de éguas com
65 EPPC.

66 Entre as terapias imunomoduladoras que estão sendo utilizadas para
67 tratar éguas com EPPC, podemos destacar o uso de células tronco
68 mesenquimais (CTMs) e o plasma rico em plaquetas (PRP). Tais tratamentos
69 têm demonstrado eficácia na modulação da resposta inflamatória no útero de
70 éguas, além de melhorar os índices de fertilidade das mesmas (FERRIS et al.,
71 2014; REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2017).

O meio condicionado por células tronco (MC) tem sido foco de novos estudos como uma possibilidade terapêutica a ser utilizada na reprodução equina (JULIE, 2009; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; PAWITAN, 2014; CORRADETTI et al., 2014). O MC é rico em fatores pré e pró-inflamatórios que são liberados durante o cultivo celular das células tronco mesenquimais (CHEN et al., 2008; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013). O MC também possui microvesículas que são responsáveis por reparação tecidual e controle do estresse oxidativo, agindo diretamente sobre a imunomodulação e regeneração do endométrio (SHEN et al., 2015; MAIA et al., 2017), mostrando-se uma excelente alternativa para uso no tratamento de éguas.

O MC, por apresentar fatores secretados pelas CTMs, é de interesse tanto na medicina humana como na veterinária, para serem utilizados em protocolos de terapia regenerativa livre de células (MAGUIRE, 2013; HAARER et al., 2015)

Desta forma, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a capacidade imunomodulatória do meio condicionado de células tronco na inflamação uterina pós-cobertura em éguas susceptíveis a EPPC, assim como sua fertilidade.

89

90 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

91 **2.1 OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO**

O meio condicionado foi adquirido a partir de um banco de células tronco equino, do laboratório OMICS Biotecnologia Animal (Botucatu- São Paulo, Brasil). O MC foi obtido após o descongelamento das células tronco mesenquimais de um banco celular, as quais foram recultivadas a uma concentração de 15×10^3 células /cm² por 3 dias, a uma temperatura de 37°C com

97 5% de saturação de CO₂. O meio recuperado da garrafa de cultivo foi
98 centrifugado a 700g e em seguida filtrado (filtro de 0,2mm) para retirar possíveis
99 detritos celulares (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; MAIA et al., 2017). O MC foi
100 dividido em alíquotas de 30 mL e armazenado em recipientes de plástico e
101 acondicionados em freezer a -20°C até a utilização. O descongelamento foi feito
102 em temperatura ambiente (25 a 28°C) por aproximadamente 1 hora. A mesma
103 partida de MC foi utilizada para tratar todas as éguas.

104

105 **2.2 ANIMAIS E CONTROLE DO CICLO ESTRAL**

106 No início do experimento, foram selecionadas 15 éguas com histórico
107 reprodutivo conhecido, classificadas como susceptíveis a EPPC como descrito
108 por Segabinazzi et al., (2017). No decorrer do experimento, os animais que não
109 se adequaram ou apresentaram algum tipo de problema foram eliminados,
110 restando, no final, apenas oito animais. Foi realizado acompanhamento diário
111 por palpação retal e ultrassonografia (Sono Scape E₂V – Hong Kong-China). A
112 indução da ovulação foi realizada a partir da detecção de um folículo ≥35 mm e
113 edema uterino grau 3, com a utilização de 1mg de acetato de deslorelina
114 (Sincrorrelin®, OuroFino, Brasil) pela via intramuscular.

115

116 **2.3 DOSE INSEMINANTE**

117 Duas éguas foram inseminadas com sêmen refrigerado (1x10⁹
118 espermatozoides), enquanto nas seis éguas restantes, foram feitas
119 inseminações nas quais se utilizaram do sêmen congelado (dose entre 200 e
120 400 milhões de espermatozoides). O processo foi realizado sempre com a
121 mesma partida e quantidade de palhetas por IA. Para inseminações, utilizando-

122 se sêmen refrigerado, as éguas foram inseminadas 24 horas após a indução,
123 com o sêmen depositado no corpo do útero. As outras seis éguas foram
124 inseminadas imediatamente após a detecção da ovulação e o sêmen depositado
125 na ponta do corno ipsilateral a ovulação. Em ambos os ciclos estrais, as éguas
126 eram inseminadas com sêmen do mesmo garanhão previamente utilizado.
127 Todos os garanhões possuíam fertilidade conhecida.

128

129 **2.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

130 Todas as éguas foram inseminadas em ciclos estrais consecutivos e
131 de maneira aleatória para cada momento sorteado previamente em *cross-over*
132 *desing*. No ciclo controle, as éguas não receberam nenhum tratamento pré ou
133 pós IA. No ciclo tratado, 30 mL de MC foi infundido no útero das éguas. Éguas
134 inseminadas com sêmen refrigerado receberam infusão intrauterina de MC no
135 momento da indução da ovulação, enquanto as éguas inseminadas com sêmen
136 congelado receberam os tratamentos 12 h após a indução da ovulação. Com
137 essa diferença no momento do tratamento, objetivou-se que o intervalo entre o
138 tratamento e IA fosse similar entre os animais no estudo. Todas as éguas foram
139 então inseminadas apenas uma vez por ciclo, com o número de
140 espermatozoides e o volume total de sêmen refrigerado ou congelado nos 2
141 ciclos (controle e tratado) previamente estabelecidos. Para os ciclos em que a
142 ovulação não ocorria dentro do período desejado, as coletas eram descartadas
143 e o ciclo estral desconsiderado.

144

145

146

2.5 COLETA DE AMOSTRAS

2.5.1 AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA

Uma higienização prévia da região perineal foi efetuada para, em seguida, ser realizada a coleta do material para o exame bacteriológico. Com o intuito de prevenir contaminações, as coletas para cultura eram realizadas previamente às coletas citológicas. As coletas foram realizadas no momento da indução e 24 horas após IA, com o auxílio de um aparelho descartável de *swab* para coleta de cultura uterina equina (Provar®, SP - Brasil). Os *swabs* eram então acondicionados em meio de transporte Stuart e refrigerados até serem enviados para um laboratório de referência para isolamento e identificação bacteriana.

2.5.2 CITOLOGIA UTERINA

Uma higienização prévia da região perineal foi efetuada e, em seguida, foi realizada a coleta do material para o exame citológico. As citologias esfoliativas foram realizadas no momento da indução (0h) e, após a IA (6 e 24 horas), com o auxílio de um aparelho descartável para coleta de citologia uterina equina (Provar®, SP - Brasil), como descrito por Alvarenga & Matos (1990). As escovas foram utilizadas para confecção de lâminas para avaliação citológica, secas em temperatura ambiente e coradas pelo método Panótico Rápido (Laborclin, Paraná – Brasil). As leituras das lâminas foram feitas através de microscopia óptica, utilizando óleo de imersão (1000x). Foram contados os neutrófilos por campo, num total de 12 campos. No final, foi feito a média de todos os campos.

2.5.3 CITOCINAS

Uma higienização prévia da região perineal foi efetuada e, em seguida, foi realizada a coleta do material para o exame das citocinas. As coletas para citocinas foram realizadas intrauterina no momento da indução (0h), 6 e 24 horas após a IA, com o auxílio de um aparelho descartável para coleta de citologia uterina equina (Provar®, SP - Brasil). As escovas foram utilizadas para coleta de material (líquido) uterino. Após cada coleta, a escova contendo o material era então colocada em um criotubo contendo 1,5 mL de RNAlater. Após todo o conteúdo da escova ser passado para o criotubo, a mesma era descartada e o criotubo lacrado e armazenado em nitrogênio líquido até posterior utilização.

As concentrações de IL-6, IL-10, IL-18 e TNF- α do líquido uterino recuperado foram mensuradas por multiplex, utilizando o kit EQCYTMAG-93K (Merck-USA) seguindo as recomendações do fabricante. O ensaio foi lido no equipamento MAGPIX (luminex, USA) e as análises dos dados foram feitas do software Milliplex Analyst - Merck-USA.

Nesse estudo, consideramos apenas a concentração de citocinas e não a quantidade de citocina colhida. Os resultados estão expressos como concentração de citocinas (pg/mL).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados para contagem de PMNs, crescimento bacteriano e citologia foram analisados com a utilização do programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., EUA). A contagem de PMNs na citologia endometrial foi avaliada através do Teste *t*. O crescimento bacteriano e a recuperação embrionária foram

196 avaliados através de teste de Exato de Fisher. Uma diferença estatística foi
197 considerada quando $P < 0,05$.

198 As análises para as interleucinas foram realizadas utilizando o software R
199 (R Core Team, 2020) com o modelo misto linear do pacote nlme (Pinheiro e
200 Bates, 2020) as médias do fator tratamento foram comparadas pelo teste t
201 ($p < 0,05$), enquanto as médias do fator tempo e interação foram comparadas pelo
202 teste tukey ($p < 0,05$).

203 **3 RESULTADOS**

204 O crescimento bacteriano antes e 24 h após a IA, assim como a
205 recuperação embrionária foram similares ($P > 0,05$) entre os grupos. À
206 recuperação embrionária, o grupo controle apresentou uma taxa de 25% (2/8) e
207 o grupo tratado de 37,5% (3/8). No entanto, observou-se que nas éguas tratadas
208 com MC, obteve-se uma contagem de PMNs (número de células por campo) na
209 citologia uterina, tanto às 6 como às 24 h após a IA menor que no grupo controle
210 ($P < 0,05$, Figura 1). Podemos observar também que a contagem de PMNs
211 diminuiu no momento 24 horas, apresentando valores inferiores aos achados
212 tanto às 6 horas, no grupo controle e tratado, como no grupo tratado às 6 horas
213 ($p < 0,05$, figura 1).

214

215

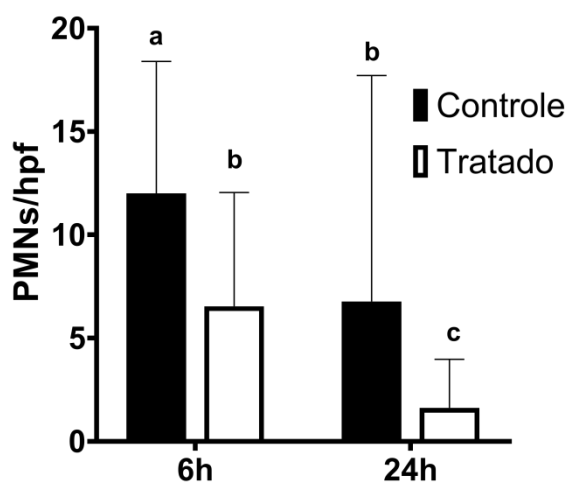


FIGURA 1. Média de células polimorfonucleadas (PMNs) na citologia endometrial de éguas tratadas (Tratado) ou não (Controle) com infusão uterina de meio condicionado de células tronco mesenquimais equinas. Letras diferentes significam $P < 0,05$.

Para a interleucina-6 (IL-6) observou-se que houve diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle e tratado com MC, em que os valores para o grupo tratado foram inferiores aos do grupo controle (tabela 1). No grupo controle houve um aumento numérico expressivo após a inseminação, o que não ocorreu no grupo tratado, no qual os valores se mantiveram semelhantes em todos os tempos.

Tabela 1. Concentração média de interleucina sérica IL-6 ($\mu\text{g/ml}$) em éguas com endometrite, tratadas com infusão de meio condicionado (Tratado) em relação ao grupo controle em função do tempo.

Trat.	Tempo			Média	p-valor		
	0	6	24		Trat.	Tempo	Interação
Controle	0,48	31,10	9,76	6,13 A	0,002	0,31	0,48
Tratado	0,009	0,01	0,06	0,019 B			
Média	0,08	1.04	1,28				

CV = 42.7%

Para a interleucina-10 (IL-10) observou-se que não houve diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle e tratado com MC. No entanto, no grupo controle, tanto no momento 6 como no 24 horas, houve uma diminuição significativa nos valores quando comparada ao tempo 0. Já no grupo tratado, o MC promoveu um pequeno aumento numérico nos valores nos tempos 6 e 24 horas pós cobertura ($p < 0,05$) (tabela 2).

240

Tabela 2. Concentração média de interleucina sérica IL-10 ($\mu\text{g/ml}$) em éguas com endometrite, tratadas com infusão de meio condicionado (Tratado) em relação ao grupo controle em função do tempo.

Trat.	Tempo			p-valor		
	0	6	24	Trat.	Tempo	Interação
Controle	18,31 aA	2,34 aB	2,34 aB	0,26	0,06	0,02
Tratado	6,83 aA	7,71 aA	9,05 aA			

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$); CV = 20,6 %

246

Para o Fator de Necrose Tumoral alfa, ($\text{TNF-}\alpha$) observou-se que não houve diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle e tratado com MC, assim como também não houve diferença dentro do mesmo tratamento. Porém, no grupo tratado houve uma queda numérica expressiva nos tempos 6 e 24 horas com relação ao tempo 0 hora (tabela 3).

252

Tabela 3. Concentração média de $\text{TNF-}\alpha$ ($\mu\text{g/ml}$) em éguas com endometrite, tratadas com infusão de meio condicionado (Tratado) em relação ao grupo controle em função do tempo.

Trat.	Tempo			p-valor		
	0	6	24	Trat.	Tempo	Interação
Controle	0,04	0,01	0,01	0,51	0,46	0,74
Tratado	0,29	0,17	0,004			

CV = 43,6 %

257

258 **4 DISCUSSÃO**

259 No presente estudo, a utilização de meio condicionado de células
260 tronco mesenquimais foi utilizado em éguas susceptíveis a endometrite na
261 tentativa de modular a resposta inflamatória pós-cobertura. Observou-se que o
262 tratamento foi efetivo na redução do número de PMNs no útero desses animais,
263 às 6 e 24 horas após o contato do sêmen. Neutrófilos são as primeiras células a
264 chegarem ao local da inflamação, já podendo ser observados no útero 30
265 minutos pós-cobertura, com uma forte reação inflamatória ocorrendo entre às 4
266 e às 24 horas após o contato do sêmen com o útero (CARD, 2005); um pico
267 inflamatório ocorrendo entre 6 e 12 horas, e uma diminuição dessa inflamação
268 ocorrendo entre 24 e 48 horas (TROEDSSON, 1994). Estes dados corroboram
269 com os achados do presente experimento, no qual foi observado uma maior
270 quantidade de neutrófilos às 6 horas pós-cobertura em ambos os grupos,
271 controle e tratado. No entanto, no grupo tratado, a quantidade de neutrófilos
272 diminuiu significativamente em 24 horas, fato não observado com os animais do
273 grupo controle. Tongu (2019) também observou redução na concentração de
274 PMNs as 6 e 24 horas pós inseminação artificial, tanto nas éguas susceptíveis
275 como nas resistentes quando os animais foram tratados com MC e no grupo
276 controle as concentrações se mantiveram altas em ambos os períodos.

277 O Meio condicionado de células tronco é considerado um subproduto
278 e nele estão contidos metabólitos, fatores de crescimento e proteínas da matriz
279 extracelular que foram secretadas pelas células tronco ali cultivadas
280 (FRESHNEY, 2005). Fatores estimulantes angiogênicos já foram identificados

281 no MC de CTMs equinas, mostrando *in vitro* uma indução da proliferação e
282 formação das células endoteliais (BUSSCHE et al., 2014).

283 Muito se tem pesquisado sobre a utilização de agentes
284 imunomoduladores como tratamento para a EPPC. Os imunomoduladores agem
285 diretamente nos mediadores inflamatórios, diminuindo a resposta exacerbada e
286 persistente da inflamação e melhorando a fertilidade dos animais (JOHNSON et
287 al., 2002).

288 Ferris et al. (2014), encontraram uma redução no número de
289 neutrófilos 6 horas pós-inseminação em éguas que foram infundidas com células
290 tronco mesenquimais (MSCs), e no tempo de 24 horas, os resultados foram
291 similares quando comparado ao tratamento placebo. Estes achados corroboram
292 com os achados encontrados em nosso estudo e com os achados de Reguini et
293 al, (2016) que observaram uma redução significativa na porcentagem de PMNs
294 após a inseminação artificial nas éguas com endometrite degenerativa crônica
295 que foram tratadas com PRP; Segabinazzi et al. (2017) demonstrou que o PRP
296 reduziu a infiltração de PMNs no lúmen uterino, além de reduzir a expressão de
297 COX-2 das éguas suscetíveis após a inseminação artificial, tendo melhores
298 resultados no tratamento pré do que na pós-inseminação. Estes trabalhos
299 demonstram o efeito anti-inflamatório do PRP (METCALF et al., 2012) na
300 modulação da resposta inflamatória uterina.

301 Pavão (2013), ao estudar éguas (10 animais) com fibrose endometrial,
302 administrou injeções endometriais de células tronco mesenquimais em cada
303 corno uterino, com uma concentração de 2×10^7 células divididas em 10 mL por
304 corno. Foram realizadas biopsias uterinas nos dias 0, 15, 30 e 60 após a
305 aplicação das células. Este estudo mostrou uma diminuição de 70,98% na área

306 de fibrose endometrial entre os tempos D0 e D60. Achados similares também
307 foram encontrados por Mambelli et al. (2013), que infundiram células tronco em
308 seis éguas com endometriose, e sete dias após a infusão foram feitas biópsias
309 uterinas por histopatologia, nos dias 21 e 61, e observaram uma melhora no nível
310 de organização tecidual e morfológica das glândulas uterinas, a quais não foram
311 observadas no grupo controle. É importante ressaltar que para participar da
312 reparação tecidual e da modulação da resposta imune, as CTMs precisam estar
313 em contato com as células do tecido lesionado.

314 Friso et al. (2019), quando utilizaram firocoxib em éguas em estro
315 próximo a ovulação, por três dias, observaram uma menor porcentagem de
316 PMNs 24 horas pós-inseminação em relação ao grupo controle. E no grupo de
317 éguas não tratadas, também observaram um aumento no acúmulo de líquido
318 intrauterino após a IA. Demonstrando que o AINE firocoxib seletiva para COX-2
319 atuou diminuindo a migração das células de defesa para o local da inflamação.
320 Estes achados estão de acordo com os encontrados por Segabinazzi et al.
321 (2017), que encontraram um aumento na expressão de COX-2 nas éguas
322 susceptíveis e demonstram que, quando tratadas com PRP, apresentaram uma
323 diminuição na expressão de COX-2 e uma diminuição no influxo de PMNs para
324 o lúmen uterino destas éguas.

325 O MC produzido pelas células durante o cultivo *in vitro*, contém
326 citocinas que são secretadas pelas células durante o desenvolvimento celular,
327 tornando o meio rico em fatores anti-inflamatórios (TGF- β , IL-1Ra, IL-6, IL-10, IL-
328 12, IL-13, IL-17 e IL-27) e pró-inflamatórios (IL-1, IL-8 / CXCL- 8 e IL-9)
329 (PAWITAN, 2014; AHMADI et al., 2017).

330 Mendonça (2016) em um estudo utilizando uma técnica semelhante à
331 que usamos em nosso trabalho, determinou o perfil de citocinas de éguas com
332 endometrite através de citometria de fluxo, e observou que os resultados antes
333 do processo de lavagem uterina por dias consecutivos (dia 1) de IFN- γ , TNF- α ,
334 IL-10, IL-6 e IL-2 foram maiores nas éguas com endometrite em comparação as
335 éguas saudáveis, e as concentrações de IL-6 e IL-10 na luz uterina foram similares
336 às observadas em nosso experimento.

337 Lange-Consiglio et al. (2013), ao tratarem lesões de ligamentos e
338 tendões de cavalos atletas, com meio condicionado de células tronco oriundas
339 da membrana amniótica, observaram um efeito anti-inflamatório e uma
340 capacidade de reorganização tecidual pós-aplicação do MC nas lesões.
341 Indicando que o MC obtido a partir de CTMs contém todos os fatores secretados
342 por estas células durante o seu cultivo e que podem ser empregado com
343 segurança em terapias regenerativas isentas de células (MAGUIRE, 2013;
344 HAARER et al., 2015).

345 Éguas resistentes mostram uma expressão aumentada de citocinas
346 anti-inflamatórias (IL-1ra, IL-10 e IL-6) e diminuição na expressão de citocinas
347 pró-inflamatórias, esse fato sugere o início da resolução do processo
348 inflamatório, enquanto éguas susceptíveis apresentam menor expressão dessas
349 citocinas no mesmo momento, com uma maior expressão IL-1 e IL-8 (FERRIS
350 et al., 2014; CHRISTOFFERSEN et al., 2013; CHRISTOFFERSEN et al., 2012).
351 Esses dados não corroboram com os achados neste estudo, no qual a IL-6
352 apresentou valores maiores no grupo controle em relação ao tratado. Enquanto
353 isso, a IL-10 se mostrou com valores inferiores no grupo controle após

354 inseminação. No grupo tratado, o MC manteve os valores tanto pra IL-6 como
355 IL-10 ao longo do tempo.

356 O MC age por mecanismo parácrino, através de proteínas
357 hidrossolúveis e microvesículas liberadas no meio durante o cultivo celular, com
358 função reguladora da resposta imune inata e adaptativa similar a utilização de
359 CTMs. Sendo assim, o MC reduz a expressão do fator de necrose tumoral e
360 interferon- γ e aumentam secreção de IL-6, IL-1ra e PGE2 (CARRADE et al.,
361 2012; GUGJOO et al., 2019). Esses dados confirmam os achados encontrados
362 nos resultados deste estudo, os quais mostraram que houve diferença entre o
363 grupo controle e tratado com MC para IL-6. Apesar dos valores mais baixos para
364 o grupo tratado e não tendo diferença estatística entre os tempos, houve uma
365 tendência de aumento nos tempos 6 e 24 horas quando comparados ao tempo
366 0 hora, fato que não ocorreu no grupo controle. Para o TNF- α , não houve
367 diferença entre os grupos controle e tratado, no entanto, no grupo tratado houve
368 um decréscimo numérico nos tempos 6 e 24 horas em relação ao tempo 0 hora.

369 Ferris et al. (2014), ao infundirem células tronco mesenquimais no
370 útero de éguas, observaram valores semelhantes de TNF- α em todos os
371 momentos quando compararam éguas tratadas e controle. Resultados
372 semelhantes aos encontrados neste estudo, os quais TNF- α mostraram valores
373 semelhantes dentro dos grupos controle e tratado em todos os tempos. Porém,
374 houve uma redução numérica nos tempos 6 e 24 horas quando comparado ao
375 tempo 0 hora no grupo tratado.

376 Em nosso estudo, a taxa de fertilidade não diferiu entre os grupos.
377 Isso se deu provavelmente devido ao número reduzido de animais no
378 experimento, no entanto, o MC melhorou numericamente a taxa de recuperação

embrionaria. Estes achados corroboram com os resultados encontrados por Tongu (2019). Da mesma forma, estudos que utilizaram imunomoduladores no tratamento EPPC apresentam aumento nos índices de fertilidade devido à redução da inflamação uterina como: PRP (SEGABINAZZI et al., 2017), glicocorticóides (BUCCA et al., 2008) e extrato de parede celular de *Mycobacterium* (CHRISTOFFERSEN et al., 2012).

385

386 **5 CONCLUSÃO**

Conclui-se que o meio condicionado de células tronco mesenquimais não foi eficiente na eliminação da infecção bacteriana intrauterina. Todavia, o MC conseguiu modular a resposta inflamatória pós-cobertura em éguas susceptíveis, diminuindo a migração de PMNs para o lúmen uterino e, além de interferir nas concentrações uterinas das interleucinas estudadas. No entanto, para fertilidade, o MC não influenciou na taxa de prenhez entre os grupos estudados.

394

395 **6 REFERÊNCIAS**

AHMADI M.; RAHBARGHAZI R.; ASLANI M.R.; SHAHBAZFAR A.A.; KAZEMI M.; KEYHANMANESH R. Bone marrow mesenchymal stem cells and their conditioned media could potentially ameliorate ovalbumin-induced asthmatic changes. **Biomed Pharmacother** 2017; 85:28–40.

400 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.127>.

401 ALVARENGA, M. A., IWANA DE MATTOS, M.C. Utilização da escova
402 ginecológica cytobrush na coleta de material endometrial de éguas. Arq. Bras.
403 Med. Vet. Zootec., v.42, p.67-8, 1990.

- 404 BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. The effect of uterine lavage
 405 performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares.
 406 Theriogenology 1991, 35, 1111–1119.
- 407 BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D. Endometritis in mares. Large Anim. Vet. Rounds,
 408 v. 3, n. 3, 2003. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/](https://www.researchgate.net/publication/213858523_Endometritis_in_mares)
 409 213858523_Endometritis_in_mares>. Acesso em: 29 nov. 2015.
- 410 BUCCA, S.; CARLI, A.; BUCKLEY, T.; DOLCI, G.; FOGARTY, U. The use of
 411 dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of
 412 persistent mating induced endometritis. Theriogenology. 2008; 70: 1093-1100.
- 413 BUSSCHE, L; VAN DE WALLE, G.R. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal
 414 Stromal Cells Promote Angiogenesis via Paracrine Stimulation of Vascular
 415 Endothelial Growth Factor Secretion in the Equine Model. **Stem Cells**
 416 **Translational Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1514-1525, 2014.
- 417 CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares.
 418 **Theriogenology**, v. 64, p. 580-588, 2005.
- 419 CARRADE DD, LAME MW, KENT MS, CLARK KC, WALKER NJ, BORJESSON
 420 DL. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-
 421 Derived Mesenchymal Stem Cells 1. **Cell Med** 2012;4:1–11.
 422 <https://doi.org/10.3727/215517912X647217>.
- 423 CHEN L, TREDGET EE, WU PYG, WU YYG. Paracrine Factors of Mesenchymal
 424 Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance
 425 Wound Healing. PLoS One [Internet]. 2008 [cited 2019 Mar 10];3(4):1886.
 426 Available from: www.plosone.org
- 427 CHRISTOFFERSEN, M.; WOODWARD, E. M.; BOJESSEN, A.M.; PETERSEN,
 428 M. R.; SQUIRES, E. L.; LEHN-JENSEN, H.; TROEDSSON, M. H. T. Effect of

immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**. 2012; 78:991–1004.

CHRISTOFFERSEN M, WOODWARD E, BOJESEN AM, JACOBSEN S, PETERSEN MR, TROEDSSON MHT, et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Vet Res** 2012; 8:41. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-41>.

CORRADETTI B, CORREANI A, ROMALDINI A, MARINI MG, BIZZARO D, PERRINI C, et al. Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Cells and Their Conditioned Media: Potential Candidates for Uterine Regenerative Therapy in the Horse. Asselin E, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Oct 31 [cited 2019 Mar 10];9(10):e111324. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111324>

DELL' AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MACEDO, L. P.; MELO, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 94: 270–3.

FERRIS RA, FRISBIE DD, MCCUE PM. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology* 2014; 82:36–42. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.015>.

FIORATTI E. G. **Estudo das catelicidinas no plasma seminal de garanhões e das interleucinas na resposta inflamatória pós-inseminação artificial em éguas**. Botucatu, 2013. 111p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina

- 453 Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita
454 Filho”.
- 455 FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5
456 Ed. Wiley Liss; New York. p. 256, 2005.
- 457 FRISO, A. M.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; CYRINO, M.; CORREAL, S. B.;
458 FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DO CARMO, M. T.; DELL'AQUA JR., J. A.; MIRÓ,
459 J.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Periovarian administration of firocoxib did
460 not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in
461 mares. **Theriogenology**, v. 138, p. 24-30, 2019.
- 462 FUMUSO, E.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.;
463 BOWDEN, R. A. endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares
464 resistant or susceptible to post-breeding endometritis effects of estrous cycle,
465 artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and*
466 *Immunopathology*, v. 96, p. 31-41, 2003.
- 467 GUGJOO MB, AMARPAL, MAKHDOOMI DM, SHARMA GT. Equine
468 Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential
469 Therapeutic Applications. **J Equine Vet Sci** 2019; 72:16–27.
470 <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2018.10.007>.
- 471 HAARER, J. et al. Caveats of mesenchymal stem cell therapy in solid organ
472 transplantation. *Transplant International*, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2015. Acessado em:
473 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082213>
- 474 JOHNSON PJ, SLIGHT SH, GANJAM VK, KREEGER JM. Glucocorticoids and
475 laminitis in the horse. **Vet Clin North Am Equine Pract** 2002; 18:219–36.
476 [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00015-9).
- 477 JULIE AUDET. Fetal Stem Cells in Regenerative Medicine. 2009; 482:440.

- 478 KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the
479 equine uterus. **Theriogenology** 1994, 41, 629–636.
- 480 LANGE-CONSIGLIO, A.; ROSSI, D.; TASSAN, S.; PEREGO, R.; CREMONESI,
481 F.; PAROLINI, O. Conditioned Medium from Horse Amniotic Membrane-Derived
482 Multipotent Progenitor Cells: Immunomodulatory Activity In Vitro and First Clinical
483 Application in Tendon and Ligament Injuries In Vivo. *Stem Cells Dev* [Internet].
484 2013; 22 (22):3015–24. Available from:
485 <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2013.0214>
- 486 LEBLANC, M. M. Persistent mating-induced endometritis. In: Robinson, N.E.
487 Current therapy in equine medicine. 5. ed. St. Louis: Elsevier Science, 2003. p.
488 234-237.
- 489 MAGUIRE, G. Stem cell therapy without the cells. *Communicative & Integrative*
490 *Biology*, v. 6, n. 6, p. e 26631, 2013.
- 491 MAIA L, DIAS MC, MORAES CN DE, AQUA CDPF, SILVEIRA LSL. Conditioned
492 medium : a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord
493 mesenchymal stem cells. 2017; 41: 239–48.
- 494 MAMBELLI, L.I.; WINTER, G.H.Z.; KERKIS, A.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS,
495 R.C.; KERKIS, I. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the
496 uterus of mares with endometrosis. **Theriogenology**. 2013, 79, 744–750.
- 497 MENDONÇA, V. H. **Variação da concentração de marcadores inflamatórios**
498 **em lavados uterinos de éguas com endometrite naturalmente acometida.**
499 2016. (TESE) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
500 Veterinária, Araçatuba, 2012.
- 501 METCALF, E. S. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid
502 and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced

503 Endometritis (PMIE). **J. Equine Vet. Sci.** [Internet]. 2014; 34(1):128. Available
 504 from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080613007211>

505 METCALF, E.S.; SCOGGIN, K.; TROEDSSON, M.H.T. The effect of platelet-rich
 506 plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following
 507 semen deposition. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar. v. 32. n.8.
 508 p.498. Aug. 2012.

509 PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.;
 510 SOARES, Z. F.; LOPES, M. D. Use of corticosteroid therapy on the modulation
 511 of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen
 512 semen. *Pferdeheilkunde*. 2008; 24: 79-82.

513 PAWITAN JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative
 514 medicine. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Aug 28 [cited 2019 Mar 10];
 515 2014:965849. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530971>

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

520 PINHEIRO J, BATES D, DEBROY S, SARKAR D, R Core Team (2020). *_nlme:*
 521 *Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_*. R package version 3.1-148,
 522 <URL:<https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>.

523 REGHINI FM, RAMIRES C, SEGABINAZZI LG, MANOELA M, CHAVES BC,
 524 PAULA C DE, et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis
 525 mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology* 2016; 86:516–22.
 526 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>.

527 REGHINI, M.F.S. **Efeito do tratamento com plasma rico em plaquetas em**
 528 **éguas resistentes e suscetíveis à endometrites persistente após**
 529 **inseminação natural**, 2013. 104f. Dissertação (Mestrado em Medicina
 530 Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP),
 531 Botucatu, São Paulo, 2013.

532 REGHINI F.M.; RAMIRES C.; SEGABINAZZI L.G.; MANOELA M.; CHAVES
 533 B.C.; PAULA C De, et al. Inflammatory response in chronic degenerative
 534 endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology** 2016;
 535 86:516–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>.

536 SEGABINAZZI, L. G.; FRISO, A. M.; CORREAL, S. B.; CRESPILO, A. M.;
 537 DELL'AQUA, J. A.; MIRÓ, J. et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte
 538 migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible
 539 mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. **Theriogenology**
 540 [Internet]. 2017; 104:120–6. Available from:
 541 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.007>

542 SEGABINAZZI, L. G. T. M. **Efeito do plasma rico em plaquetas pré ou pós-**
 543 **inseminação artificial sobre a resposta inflamatória e índice de fertilidade**
 544 **em éguas susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura**. Botucatu,
 545 2016. 67p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e
 546 Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

547 SHEN C, LIE P, MIAO T, YU M, LU Q, FENG T, et al. Conditioned medium from
 548 umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. **Mol**
 549 **Med Rep.** 2015; 12(1):20–30.

550 TONGU, E. A. O. **Efeito da adição de meio condicionado por células tronco**
 551 **mesenquimais na viabilidade espermática e resposta inflamatória uterina**

552 **pós inseminação artificial em equinos.** Botucatu, 2019. 41p. Dissertação
553 (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade
554 Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

555 TRAUB-DARGATZ, J.L.; SALMAN, M.D.; VOSS, J.L. Medical problems of adult
556 horses, as ranked by equine practitioners. Journal of American Veterinary
557 Association. v.198 p.1745-1747. 1991.

558 TROEDSSON, M. H. T. Uterine defense mechanisms in the mare. **Arch. Std/Hiv**
559 **Res.**, v. 8, p. 259-269, 1994.

560 TROEDSSON, M.H.T; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm transport and survival in
561 the mare: a review. Theriogenology, v.50. p. 807-818, 1998.

562 TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent
563 endometritis in the mare. Theriogenology, 1999; v.52 p.461–471.
564 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00143-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00143-0)
565
566
567
568
569
570