UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO DAS CATELICIDINAS NO PLASMA SEMINAL DE GARANHÕES E DAS INTERLEUCINAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS

EDUARDO GORZONI FIORATTI

Botucatu – SP

Agosto 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO DAS CATELICIDINAS NO PLASMA SEMINAL DE GARANÕES E DAS INTERLEUCINAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS

EDUARDO GORZONI FIORATTI

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Co-orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr.

Botucatu – SP

Agosto 2013

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

Fioratti, Eduardo Gorzoni.
Estudo das catelicidinas no plasma seminal de garanhões e das interleucinas na resposta inflamatória pós-inseminação artificial em éguas / Eduardo Gorzoni Fioratti. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Marco Antonio Alvarenga
Coorientador: João Pessoa Araújo Junior
Capes: 50504002

1. Equino - Doenças. 2. Éguas - Inseminação artificial. 3. Útero - Inflamação. 4. Endométrio - Inflamação.

Palavras-chave: Catelicidinas; Endometrite; Equino; Interleucinas; Peptídeo antimicrobiano.

Nome do autor: Eduardo Gorzoni Fioratti

Título: ESTUDO DO PAPEL DAS CATELICIDINAS E INTERLEUCINAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adjunto Marco Antonio Alvarenga
Presidente e orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Frederico Ozanam Papa
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Pesq. Fabiana Ferreira de Souza
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Doutor Rubens Paes de Arruda
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ - USP - Pirassununga

Prof. Doutor Eduardo Malschitzky
Departamento de Reprodução Animal
Universidade Luterana do Brasil - ULBRA - Canoas

Botucatu, 27 de agosto de 2013

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado guiando meus passos e por todas as pessoas que colocou e retirou da minha vida e pelos desafios que me ajudou a transpor.

A minha família por sempre estar ao meu lado, nos bons e maus momentos, pela amizade, amor, carinho, paciência e dedicação. A minha mãe, uma vencedora e um exemplo a ser seguido.

A Ana Izabel, tudo isso é por você e para você, sem seu apoio essas conquistas não teriam se concretizado e nem mesmo teriam algum sentido.

Toda a minha a gratidão ao professor Marco Antonio Alvarenga, meu orientador, pela confiança incondicional e por acreditar no meu potencial.

Impossível não mencionar a atenção e ajuda sempre precisa do professor João Pessoa Araújo Junior, meu co-orientador, pelos ensinamentos e auxílio durante o projeto.

Alguns amigos ficam marcados em nossas vidas simplesmente por compartilharem momentos, não importando se bons ou ruins, meu muito obrigado a essas pessoas ímpares: Marcel (braxola), Carlos Renato, Leandro (alemão) e Rodrigo (ruffles), Danilo (peba), Gabriel Felício e Gabriel Greco.

Agradecimento especial a um amigo que fiz durante a execução do experimento pela ajuda e orientação nas práticas laboratoriais, muito obrigado ao Ricardo Seiti Yamatogi.

Não se pode mensurar as amizades que aqui conquistei, por isso seria injusto de minha parte citar nomes. No desenrolar do período de pós graduação todos meus colegas têm enorme mérito, dou graças por compartilharmos nossas vidas.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, Frederico Ozanam Papa, Nereu Carlos Prestes, Sony Dimas Bicudo, João Carlos Pinheiro Ferreira, Cezinande de Meira, Eunice Oba, Fernanda da Cruz Landim e Maria Denise Lopes por todos estes anos de boa convivência e por sempre terem me ajudado quando precisei. Agradeço a cada um de vocês por compatilhar comigo o conhecimento.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal: Edilson, Walter, Zé Luis, Edivaldo e Cristina, por sempre me ajudar quando precisei e pelas boas conversas.

A todas as pessoas que conviveram comigo na FMVZ durante estes anos e que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha história.

Não podemos esquecer dos animais, a razão de nosso trabalho. Obrigado

À FAPESP, pelo apoio financeiro sem o qual a execução não teria sido possível.

A todos vocês muito OBRIGADO.

"Pedi a Deus, para ser forte
a fim de executar projetos grandiosos,
e Ele me fez fraco
para conservar-me humilde.

Pedi a Deus que me desse saúde
para realizar grandes empreendimentos,
e Ele deu-me a doença
para compreendê-lo melhor.

Pedi a Deus riqueza, para tudo possuir,
e Ele deixou-me pobre para não ser egoísta.
Pedi a Deus poder, para que os homens
precisassem de mim,
e Ele deu-me a humildade para que
d-Ele precisasse.
Pedi a Deus tudo para gozar a vida,
e Ele me deu a vida para gozar de tudo.

Senhor, não recebi nada do que pedi,
mas deste-me tudo que
eu precisava.

E, quase contra a minha vontade,
as preces que não fiz foram ouvidas.
Louvado seja ó meu Deus!
entre todos os homens

NINGUÉM TEM MAIS DO QUE EU!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequência de aminoácidos dos peptídeos sintéticos das catelicidinas equinas 29

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas alvo. Primer forward e reverse das proteínas alvo 40

TABELA 3. Concentração total de proteína nas amostras de plasma seminal de garanhões (n=15) e quantidade de proteína nas bandas proteicas de interesse (bandas 1, 2 e 3) 44

TABELA 4. Concentração (ng/ml) das catelicidinas equinas no plasma seminal de garanhões 46

TABELA 5. Valores médios (mm) e porcentagem de redução (%) da altura da coluna de líquido acumulado na região da bifurcação uterina de éguas resistentes e susceptíveis a EPPC do momento M2 para o M3 49

TABELA 6. Medianas e variância da expressão relativa do RNAm da IL-1β nas células endometriais de éguas susceptíveis e resistentes e os efeitos do plasma seminal e da inseminação artificial 53

TABELA 7. Medianas e variâncias da expressão relativa do RNAm da IL-8 nas células endometriais de éguas susceptíveis e resistentes e os efeitos do plasma seminal e da inseminação artificial 55

TABELA 8. Comparação da expressão relativa do RNAm das interleucinas 1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α as 24 (M2) e 48 (M3) horas o após desafio uterino 58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1A. Curva exponencial gerada a partir dos resultados obtidos para o antígeno sintético eCATH 1 31

FIGURA 1B. Curva logarítmica gerada a partir dos resultados obtidos para os antígenos sintéticos eCATH 2 e 3. 32

FIGURA 2A. Representação gráfica da curva de amplificaçãodo gene GaPDH e as diluições relativas (100;10;1 e 0,1) da amostra de referência..... 41

FIGURA 2B. Representação gráfica da curva de dissociação das amostras da curva relativa padrão do gene GaPDH da amostra de referência. 41

FIGURA 2C. Representação gráfica da curva padrão da amostra de referência onde no eixo x encontra-se o log da concentração relativa e eixo y o valor de cT (threshold cycle), r^2:0,99 e Slope: 3,52 demonstrando eficiência de 92,3%..... 41

FIGURA 3. Gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) de amostras de plasma seminal de garanhões corado com Coomassie Azul 0,1% (à esquerda). Representação gráfica da quantidade média de proteína por banda detectada em todas as amostras de plasma seminal (à direita) 45

FIGURA 4. Localização das bandas proteicas de interesse (peso molecular similar às catelicidinas) no gel de eletroforese (SDS-PAGE) de plasma seminal equino corado com Coomassie Azul 0,1% 46

FIGURA 5. Foto representativa dos “dots” gerados a partir do teste dot-blotting e seu respectivo modo de leitura. a coluna 1 (esquerda) é o antígeno sintético eCATH 3 nas concentrações de 10; 50; 100 e 200ng. as colunas restantes são os “dots” gerados a partir de amostras de plasma seminal de 15 garanhões selecionados..... 46

FIGURA 6. Média dos valores da coluna de fluído visualizado na área da bifurcação uterina (mm) nos momentos M2 e M3 em éguas resistentes e susceptíveis a EPPC. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M2, 24 horas após a infusão de plasma seminal ou a inseminação artificial; M3, 48 horas após a infusão de plasma seminal ou inseminação artificial; S, éguas susceptíveis ; R, éguas resistentes. ^{A,b} letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p<0.05$)..... 48

FIGURA 7. Porcentagem de neutrófilos observados em exame citológico ao longo do tempo analisado para as éguas resistentes e susceptíveis a EPPC. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, 24 horas após a indução da ovulação, M2, 24 horas após a infusão de plasma seminal ou a inseminação artificial; M3, 48 horas após a infusão de plasma seminal ou inseminação artificial..... 51

FIGURA 8. Quantificação da expressão relativa da IL-6 em relação ao GaPDH. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, momento 1; M2, momento 2; M3, momento 3. * diferença estatística para o grupo de égua e tratamento utilizado. A e B, letras diferentes no mesmo tratamento indicam diferença estatística entre as éguas resistentes e susceptíveis 54

FIGURA 9. Quantificação da expressão relativa da IL-10 em relação ao GaPDH. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, momento 1; M2, momento 2; M3, momento 3. * diferença estatística para o mesmo tratamento em um momento específico. A e B, letras diferentes indicam diferença estatística entre os momentos para um tratamento específico 57

FIGURA 10. Quantificação da expressão relativa do TNF-α em relação ao GaPDH. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, momento 1; M2, momento 2; M3, momento 3. * diferença estatística entre tratamentos em um momento específico. 58

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

Ag = Antígeno

EPPC = Endometrite Persistente Pós –Cobertura

IA = Inseminação artificial

PMNs = neutrófilos polimorfonucleares

IL = Interleucina

TNF-α = Fator de necrose tumoral alfa

RNA = ácido ribonucleico

DNA = ácido desoxiribonucleico

MHC II = complexo de histocompatibilidade maior tipo II

AMPs = peptídeos antimicrobianos

eCATH = catelicidina equina

g = gravidade

mL = mililitro

µL = microlitro

µL/mL = microlitro/ mililitro

mm = milimetro

µg = micrograma

mg = miligrama

mg/mL = miligrama/ mililitro

mM = milimolar

kDa = kiloDalton

°C = graus Celsius

SDS – PAGE = sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis

BCA = ácido bicinconínico

pH = potencial do hidrogênio

mA = miliAmper

V = Volts

cm = centímetro

NaCl = cloreto de sódio

TRIS = tris(hydroxymethyl)aminomethane

ng = nanograma

TBS = Tris Buffered Saline

TTBS = Tween Tris Buffered Saline

TCBS = Tween Citrate Buffered Saline

IgG = imunoglobulina G

< = menor

> = maior

% = porcentagem

I.M. = Intramuscular

Mhz = mergaHertz

vs = *versus*

ON = óxido nítrico

$PGF_{2\alpha}$ = prostaglandina F 2 alfa

Células NK = células Natural Killer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 3

2.1. Etiopatogenia da endometrite persistente pós cobertura 3

2.2. Mecanismos de defesa uterina 5
2.2.1. Contrações uterinas 6
2.2.2. Inflamação local 7

2.3. Influência do plasma seminal 21

3. OBJETIVOS 26

4. MATERIAL E MÉTODOS 27

4.1. Garanhões 27
4.1.1. Seleção de garanhões e colheita e processamento do plasma seminal 27
4.1.2. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) 27
4.1.3. Dot-blotting 29

4.2. Éguas 32
4.2.1. Seleção dos animais 32
4.2.2. Colheita de sêmen e preparo das doses 33
4.2.3. Controle estral, induçao de ovulaçao, ciclo controle ou infusões uterinas ou IA 34
4.2.4. Colheita e processamento do material uterino 35
4.2.4.1. Momentos de coleta de material 35
4.2.4.2. Ultrassonografia uterina 37
4.2.4.3. Citologia uterina 37
4.2.5. qPCR 38

4.3. Análise Estatística 42

5. RESULTADOS 43

5.1. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) 43

5.2. Dot-blotting – concentração das catelicidinas no plasma seminal de garanhões 46

5.3. Ultrassonografia uterina 48

5.4. Citologia exfoliativa uterina 50

5.5. qPCR 51

6. DISCUSSÃO 60

6.1. Catelicidinas equinas no plasma seminal de garanhões 60

6.2. Expressão uterina de interleucinas 62

6.3. Citologia exfoliativa uterina 70

6.4. Ultrassonografia uterina 76

7. CONCLUSÕES 78

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

Fioratti, E.G. **Estudo das catelicidinas no plasma seminal de garanhões e das interleucinas na resposta inflamatória pós-inseminação artificial em éguas.** Botucatu, 2013. 117p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A expressão das interleucinas no útero e das catelicidinas no plasma seminal podem ser responsáveis pela magnitude e persistência da resposta inflamatória uterina. Os objetivos desse estudo foram verificar a presença das catelicidinas no plasma seminal e caracterizar a resposta imune uterina pela expressão de interleucinas inflamatórias. O plasma seminal foi obtido por coleta de sêmen de 15 garanhões e submetido ao SDS-PAGE e DOT-blotting. As éguas foram submetidas a um ciclo estral sem desafio uterino (T1), com infusão de plasma seminal (T2) e inseminação artificial (T3). Exame ultrassonográfico, citologia exfoliativa uterina e colheita de células para a expressão do RNAm das interleucinas por qPCR foram realizados durante 3 ciclos consecutivos aleatoriamente, 24 (M1), 48 (M2) e 72 horas (M3) após a indução da ovulação. A expressão do RNAm no endométrio das éguas resistentes e susceptíveis foi verificada para as interleucinas IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α. A concentração total de proteínas no plasma seminal dos garanhões variou de 6,3 a 25,6 mg/mL. O SDS-PAGE revelou a existência de 3 bandas protéicas dentro do intervalo de peso molecular previamente citado na literatura para as catelicidinas equinas. Os garanhões avaliados mostraram quantidades de eCATH1 < 339,6ng, eCATH2 < 141,3ng e eCATH3 < 283,4ng. No momento M2 não foi possível diferenciar as éguas resistentes das susceptíveis pela citologia ou ultrassonografia independente da infusão com plasma seminal, inseminação artificial ou da ovulação, mas quando há presença de espermatozoides no útero a resposta inflamatória é mais intensa. Durante o momento M3, as éguas susceptíveis apresentaram maior volume de fluido uterino acumulado em todos os tratamentos com menor capacidade de limpeza uterina. Foi verificada maior expressão do RNAm das interleucinas pró-inflamatórias nas éguas susceptíveis e a expressão do RNAm da interleucina-10 é semelhante entre as éguas resistentes e susceptíveis.

Palavras-chave: Equino, endometrite, peptídeo antimicrobiano, interleucinas

Fioratti, E.G. **Role of seminal plasma cathelicidins and interleukins on the post-breeding inflammatory reaction.** Botucatu, 2013. 117p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

In the equine species, uterine interleukin expression and seminal plasma cathelicidins can modulate the magnitude and persistence of the post-breeding inflammatory reaction. The objectives were to verify the presence of cathelicidins in the stallion seminal plasma and characterize the uterine immune response by pro and anti-inflammatory interleukins. Seminal plasma was obtained by semen collection of 15 stallions and submitted to SDS-PAGE and DOT-blotting tests. Three experiments were designed to study interleukin expression during baseline (T1), after seminal plasma infusion (T2) and artificial insemination (T3). Endometrial cytology and cell collection as well as ultrassonographic evaluations were performed to access interleukin mRNA through qPCR during three randomly assigned consecutive estrous cycles, 24 (M1), 48 (M2) and 72 hours (M3) after an ovulation was induced. Endometrial mRNA expression in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis was identified for the following pro-inflammatory cytokines: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α. Total seminal plasma protein concentrations ranged from 6.3 to 25.6 mg/mL. SDS-PAGE analysis identified the existence of three proteic bands with molecular weight similar to what was previously reported for equine cathelicidins. Evaluated stallions showed values < 339.6 ng for eCATH1, < 141.3 ng for eCATH2 and < 283.4 for eCATH3. At M2, resistant and susceptible mares could not be separated through cytology or ultrassonography, even though the presence of sperm strongly stimulates uterine inflammatory reaction. At M3, susceptible mares showed higher uterine fluid accumulation and lower uterine clearance. Pró-inflammatory mRNA expression was higher in susceptible mares and interleukin-10 mRNA expression was similar between resistant and susceptible mares.

Key-words: Equine, endometritis, antimicrobial peptide, interleukin

1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva dos equinos se baseia nas colheitas de sêmen e na obtenção do maior número de prenhezes, tanto tradicionais quanto de embriões transferidos. Porém, essa rotina oferece desafios cada vez maiores à capacidade desses animais se reproduzirem. Assim sendo, um dos grandes obstáculos a serem transpostos são as desordens de origem uterina que, consequentemente, trazem grandes prejuízos à fertilidade das éguas, pois a maioria delas têm efeito deletério sobre todas as fases iniciais de estabelecimento e manutenção da gestação, além de aumentar os custos com tratamentos insatisfatórios.

Após a cobertura de uma égua ocorre uma inflamação fisiológica e transitória que serve para a retirada do excesso de espermatozoides mortos e de outros contaminantes uterinos advindos da deposição do sêmen. Essa inflamação é causada principalmente pela presença das células espermáticas no útero e se caracteriza pela rápida infusão de neutrófilos uma hora após a detecção da presença dos espermatozoides e pela formação de um exsudato intrauterino levando à endometrite (CARD, 2005; TROEDSSON et al., 1998; TROEDSSON, 1999).

A endometrite é uma condição uterina que envolve inflamação e muitas vezes, por consequência, infecção do endométrio, sendo uma das causas mais importantes e frequentes de sub-fertilidade e de baixa eficiência reprodutiva em éguas (CARD, 1997; NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1999; TROEDSSON, 1999). Além da inflamação fisiológica normal que sempre ocorrerá na fêmea equina após o contato do útero com os espermatozoides surge, para um grupo específico de éguas, uma inflamação de forma persistente. As fêmeas com persistência da inflamação uterina além das 48 horas após a

cobertura apresentam importante falha no processo de limpeza uterina associada à reação inflamatória exacerbada e persistente no útero, acúmulo de líquido no lúmen uterino e queda nas taxas de fertilidade pela incompatibilidade ao desenvolvimento embrionário devido a luteólise prematura e ao efeito deletério desse conteúdo ao embrião (TROEDSSON, 1999).

A luteólise prematura pela liberação de prostaglandina e o efeito deletério desse conteúdo uterino sobre o embrião são responsáveis pela baixa fertilidade nas éguas susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura (EPPC), que representam aproximadamente 15% dos animais em atividade reprodutiva (ZENT et al., 1998). Os tratamentos da EPPC são paliativos focados em combater as consequências da reação inflamatória e dar a mínima condição ao útero de manter um embrião viável, porém o ideal seria o controle da intensidade da inflamação e a diminuição de sua persistência, tornando-a mais efetiva em um intervalo de tempo menor impedindo lesões uterinas subsequentes e favorecendo a fertilização e a sobrevivência embrionária.

O ambiente uterino sadio oferece as condições ideais para que ocorra inicialmente o transporte espermático ao sítio de fecundação e, posteriormente, o desenvolvimento embrionário. Os tratamentos comumente utilizados não alcançam eficiência no controle da resposta inflamatória descompensada que as éguas susceptíveis apresentam após o contato com o sêmen do garanhão. Dessa forma, se faz necessário um melhor entendimento do início desse processo inflamatório para que se possa controlar essa resposta celular não permitindo que se torne um ato contínuo e persistente de agressão ao útero. Uma das opções é unir ao tratamento sintomático à intervenção, em nível molecular, sobre a liberação e produção dos marcadores inflamatórios envolvidos nesse processo que irão, por sua vez, controlar a intensidade e duração da resposta imune celular uterina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiopatogenia da endometrite persistente pós-cobertura

A mucosa do trato reprodutivo possui um sistema imune pelo qual bactérias, fungos, sêmen, fezes e urina são retirados do útero por uma combinação entre os fatores celulares, humorais e mecânicos de drenagem para a limpeza uterina. Quando existe incompetência de qualquer um desses mecanismos naturais de defesa a endometrite se instala de forma persistente (ASBURY, 1986; ASBURY, 1987; LeBLANC, 2003).

Tanto a monta natural como a inseminação artificial (IA) são consideradas causas principais de endometrite persistente pós cobertura (EPPC), uma vez que a presença do espermatozoide é o principal fator para a indução da resposta inflamatória local (KOTILAINEN et al., 1994).

A inflamação fisiológica e transitória após a cobertura é necessária para a limpeza do excesso de espermatozoides mortos e de outros contaminantes que por ventura acompanham o sêmen. A inflamação é causada principalmente pela presença dos espermatozoides no útero e se caracteriza por uma rápida infusão de neutrófilos logo após esse contato (CARD, 2005; TROEDSSON et al., 1998; TROEDSSON, 1999).

Nas éguas, tanto as células espermáticas quanto o plasma seminal no interior do útero são capazes de ativar o mecanismo inflamatório. Pela quimiotaxia, os espermatozoides promovem massiva invasão de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) no lúmen uterino responsáveis pela fagocitose dessas células. Essa inflamação leva a liberação de prostagladina (PGF2α) causando contrações miometriais, que são

essenciais para a limpeza uterina. Dessa forma, a presença do espermatozoide pode ser considerada como a principal causa da inflamação, contudo poderá causar infertilidade nas éguas susceptíveis (TROEDSSON, 1997, TROEDSSON et al., 2002).

Após o sêmen ser depositado no útero é transportado rapidamente por contrações miometriais até a tuba uterina, processo que leva quatro horas e apenas uma pequena parte dos espermatozoides alcança esse sítio de fertilização, sendo o restante eliminado do ambiente uterino (CAMPBELL e ENGLAND, 2006). Contudo, nas éguas susceptíveis, devido a uma diminuição da contratilidade uterina, há um maior acúmulo de líquido no interior do útero quando comparadas às éguas resistentes a essa alteração. A secreção acumulada pode atuar como meio de cultura para agentes oportunistas agravando o quadro patológico. Normalmente, as éguas controlam a inflamação dentro de 24 a 36 horas, contudo quando isso não ocorre há um acúmulo de fluido inflamatório no lúmen uterino resultando em um ambiente desfavorável para o futuro desenvolvimento embrionário (LeBLANC, 2003).

A persistência da inflamação geralmente é causada por alterações degenerativas que ocorrem continuamente no útero equino em resposta ao número de partos e a idade; a perda do suporte estrutural do trato reprodutivo pelo estiramento dos ligamentos largos em decorrência de prenhezes repetidas resultam no deslocamento cranial e ventral do útero para o abdomen, desta forma dificultando a drenagem do seu conteúdo pela cérvix. Portanto, os animais mais comumente afetados são fêmeas multíparas acima de 14 anos de idade que apresentam útero insinuado na cavidade abdominal, cistos endometriais, cérvix com aderências e fibrose que leva a perda da integridade e funcionalidade, e pobre conformação perineal (LeBLANC, 2003). Além disso, há redução na frequência, intensidade e duração da atividade miometrial por mudanças na liberação de prostaglandinas e ocitocinas, nos receptores neuromusculares ou mudanças

intrínsecas na musculatura uterina promovendo uma incapacidade de responder aos estímulos de contração (RIGBY et al., 2001).

A presença de mais de 2 centímetros de fluido uterino, durante a fase de estro, tem sido considerada como o fator principal para a detecção precoce das éguas que são susceptíveis à EPPC (BUCCA et al., 2008), uma vez que essas éguas com fluido retido o apresentam também durante o diestro (BRINSKO et al., 2003). O líquido uterino pode estar livre no lúmen uterino ou encapsulado por um tecido cicatricial fibrótico, esse ponto de acúmulo de líquido torna o útero mais susceptível às infecções e impossibilita a implantação embrionária ou a sobrevivência do embrião (LEFRANC & ALLEN, 2008), já que éguas com cultura uterina positiva anteriormente à cobertura têm menores taxas de prenhez do que aquelas que são negativas (RIDDLE et al., 2007).

A qualidade endometrial deve ser considerada como um marcador da saúde do útero (LUDWIG et al., 2001, SCHLAFER, 2007) estando correlacionada à susceptibilidade a endometrite infecciosa e persistente pós cobertura (WOODWARD et al., 2012). A baixa qualidade endometrial está associada a idade e diminuição da fertilidade, uma vez que o endométrio sadio apresenta glândulas ativas e bem distribuídas com poucas ou nenhuma célula inflamatória e um endométrio comprometido mostra as glândulas inativas rodeadas por camadas de células fibróticas com grande infiltração inflamatória (KENNEY & DOIG, 1982), quanto maior o comprometimento estrutural do útero maior o potencial à EPPC (ALGHAMDI et al., 2005; WOODWARD et al., 2012).

2.2. Mecanismos de defesa uterina

2.2.1. Contrações uterinas

O papel das contrações uterinas é o de remover os produtos inflamatórios, que muitas vezes tornam-se nocivos para o endométrio, e expulsar debris resultantes da lesão tecidual e da morte celular (GALINDO et al., 2003; TROEDSSON, 1999).

A atividade contrátil uterina é consequência da despolarização e repolarização da membrana plasmática das células do músculo liso uterino. Há uma região do miométrio do corno uterino que inicia o pulso contrátil em direção a cérvix; essa região nas éguas susceptíveis aparece mais frequentemente no corpo uterino. Essa localização pode ser advinda de uma hipertrofia por seguidas prenhezes ou por um fator intrínseco das éguas acometidas. Em um estudo *in vitro* foi observado que o útero de éguas susceptíveis exibe uma disfunção contrátil do miométrio e que pode ocorrer um defeito na sinalização neuronal resultando em mau funcionamento do miométrio (REITZENSTEIN et al., 2002).

Nikolakopoulos et al. (2000) relataram que a cobertura, o estímulo mecânico da vagina e da cérvix e a distensão uterina volume-dependente geralmente causam aumento na concentração plasmática de ocitocina e, portanto, um aumento nas contrações miometriais, sem necessariamente afetar as concentrações plasmáticas dos metabólitos da prostaglandina. Constatou-se que o número total, a amplitude média e a duração média das contrações dos cornos uterinos não dependem do lado onde ocorre a ovulação, no entanto, a monta natural pode aumentá-los significativamente em todas as regiões do útero sem alterar sua direção, com aproximadamente metade sendo no sentido cervico-tubárico e a outra metade no sentido contrário (CAMPBELL & ENGLAND, 2006).

O óxido nítrico (ON), um subproduto do processo inflamatório produzido por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais, é encontrado no fluido uterino após a cobertura causando relaxamento do miométrio. O ON controla o tônus vascular, a neurotransmissão, produção de hormônios, diferenciação celular, expressão gênica e a ativação de células do sistema imune (MOIRA, 1998). A concentração de ON não difere com a utilização de sêmen fresco ou congelado, porém, 13 horas após a cobertura foi verificada menor concentração no útero das éguas resistentes quando comparadas as susceptíveis a EPPC (ALGHAMDI & TROEDSSON, 2002).

Alghamdi et al. (2005) propõem que o óxido nítrico é um mediador do relaxamento da musculatura lisa responsável por manter a atividade mioelétrica abaixo da linha basal entre 7 e 19 horas do início do processo inflamatório nas éguas susceptíveis a EPPC. Porém, em um estudo realizado por Fioratti (2010) ficou demonstrado que a concentração de ON no fluído uterino é maior para as éguas susceptíveis 8 horas após a inseminação artificial, mas passadas 24 horas a concentração de ON no líquido acumulado no lúmen uterino é semelhante entre as éguas resistentes e susceptíveis.

2.2.2. Inflamação local

O útero é capaz de responder aos antígenos com a liberação de fatores quimiotáticos que levam a uma rápida migração de PMNs para o interior do lúmen uterino (ASBURY et al., 1982; WATSON et al., 1987; TROEDSSON et al., 1993). Este processo é caracterizado pela presença da resposta imune celular e é mediado pela ativação do sistema complemento (KOTILAINEN et al., 1994; TROEDSSON, 1997; KATILA, 1995), portanto o contato do sêmen com o endométrio causa uma reação

inflamatória em éguas devido à presença das células espermáticas no interior do útero (KOTILAINEN et al., 1994; TROEDSSON, 1995).

Kotilainen *et al*. (1994) demonstraram que a leucodiapedese é induzida pelos espermatozoides no útero e que a intensidade do influxo de PMNs está diretamente relacionada à concentração espermática. A quimiotaxia para os PMNs está associada com a habilidade do espermatozoide ativar o sistema complemento, resultando na formação de C5a, C5b e C3b; o C3b é uma opsonina e C5a é quimiotáxico para o espermatozoide (TROEDSSON et al., 2005). Hakansson et al (1993) concluiram que o complemento com atividade de opsonização está presente no útero das éguas mesmo antes da resposta inflamatória e que esta atividade faz parte da resposta imune local.

Após uma agressão ocorre um aumento da permeabilidade vascular no local afetado, fazendo com que um exsudato extravase para o tecido agredido, sendo esse o primeiro mecanismo de defesa. Com o início das alterações vasculares as células de defesa como neutrófilos, eosinófilos e monócitos se aderem ao endotélio dos vasos para migrarem ao tecido agredido; os neutrófilos são as primeiras células a transpor a parede vascular por sua maior mobilidade (COLLINS et al., 1999).

Uma reação inflatória intensa ocorre entre 4 e 24 horas após o contato do sêmen com o útero (CARD, 2005; RIGBY et al., 2001). Em fêmeas com um sistema imunológico funcional, a maioria dos produtos inflamatórios é removida do útero dentro de 24 a 36 horas após a contaminação (AABURY, 1986; LeBLANC, 2003; TROEDSSON, 1999). Nas éguas susceptíveis, ocorre uma resposta inflamatória exacerbada e persistente com contínua migração de neutrófilos atraídos pela quimiotaxia pelos espermatozoides, tornando o útero incompatível com o desenvolvimento embrionário (TROEDSSON, 1999; CARD, 2005).

O mecanismo celular é representado na fase aguda principalmente pelos neutrófilos, os quais constituem a primeira linha de defesa do organismo e são atraídos por quimiotaxia por vários mediadores inflamatórios, atuando na eliminação de antígenos pela fagocitose (ASBURY, 1986; GALINDO et al., 2003). Esses neutrófilos dispersos no fluído acumulado no lúmen uterino compõem o sistema de defesa celular durante as primeiras 24 horas após a cobertura e apesar de apresentarem maior concentração no líquido acumulado no útero das éguas susceptíveis em comparação as resistentes a EPPC, para o mecanismo de defesa celular não foi verificada diferença entre a capacidade fagocítica dos neutrófilos uterinos entre essas duas classes de éguas (FIORATTI, 2010), apesar de estudos iniciais hipotetizarem que as éguas susceptíveis teriam neutrófilos com habilidade fagocítica reduzida (CHEUNG et al., 1985; WATSON et al., 1987; LIU et al., 1985), porém foi verificado que as secreções uterinas das éguas susceptíveis diminuem a capacidade de opsonização (TROEDSSON et al., 1993b).

O útero responde rapidamente à presença de um antígeno com liberação de mediadores quimiotáxicos, produtos inflamatórios complementares como prostaglandina E, prostaglandina $F_2\alpha$, leucotrieno (LTB4) e interleucinas (IL-6 e IL-8) que são responsáveis pelo rápido influxo de PMNs para o lúmen uterino. O sistema complemento é mediador de reações de defesa uterina atuando no aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização pré-fagocitose, ativação de lipases de membrana e lise do organismo alvo (TROEDSSON et al., 2008).

As citocinas são proteínas primariamente secretadas pelos leucócitos e são responsáveis pelo estímulo das defesas humoral e celular e pela ativação de células que realizam a fagocitose. Dentre as citocinas, as secretadas pelos monócitos são chamadas de monocinas, enquanto aquelas que são secretadas pelos linfócitos são denominadas de

linfocinas. Entretanto, no grupo das linfocinas algumas são denominadas interleucinas, que podem ser secretadas por outros tipos celulares que não fazem parte do sistema imune, mas possuem a capacidade de afetar a resposta celular principalmente ligada a funcionalidade dos leucócitos (TIZARD, 1998).

As principais fontes de citocinas são os tecidos adiposos subcutâneo e visceral (adipocinas), assim sendo, o aumento da massa de tecido adiposo corpóreo está associado com alterações da produção de adipocina com aumento da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e da interleucina 6 (IL-6), uma vez que as células gordurosas contribuem com 1/3 da concentração circulante de IL-6, motivo pelo qual as éguas mais velhas e com menor musculatura e acúmulo de gordura apresentem maior expressão da IL-6 (CARVALHO et al., 2006).

Apesar do acúmulo de gordura corpórea estar relacionado à maior produção de TNF-α e IL-6, foi verificado em cavalos de corrida jovens (± 2 anos de idade) que 2 horas após o treinamento a expressão IL-1β e TNF-α se apresentaram aumentadas. Estas mudanças na expressão das interleucinas são dependentes do tempo e da intensidade do exercício, dessa forma, foram observados sinais de adaptação ao treinamento com uma redução na expressão destas interleucinas, muito mais precoce para o TNF-α. Entretanto, a expressão de IL-6 aumentou com o condicionamento ao exercício, portanto a expressão do mRNA de IL-1β e TNF-α, nesse caso, é inversamente correlacionada à expressão de mRNA de IL-6 (HOROHOV, 2012).

Foi constatado em vacas com endometrite pós-parto que quanto mais severo for o processo inflamatório, maior será a lesão ao tecido agredido e maior será a expressão das interleucinas do tipo 1β, 6, 8, TNF-α. A IL-8 coordena o recrutamento de PMNs e outras células da imunidade inata para o sítio inflamado; a IL-6 regula a síntese das proteínas inflamatórias da fase aguda (CHAPWANYA et al., 2009).

A IL-1 é uma das mais importantes do sistema immune, sua função predominante é a de aumentar a ativação das células T em resposta a um antígeno. Há duas proteínas distintas para IL-1, denominadas IL-1α e -1β, as quais são 26% homólogas. As IL-1 são secretadas primariamente pelos macrófagos, mas também pelos neutrófilos, células endoteliais, células da musculatura lisa, células da glia, astrócitos, células B e T, fibroblastos e queratinócitos. A produção de IL-1 por esses diferentes tipos de células ocorre somente em resposta à estimulação celular (TIZARD, 1998).

A IL-6 é produzida pelos macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e células T-helper ativadas atuando em sinergismo com a IL-1 e TNF-α. A IL-6 é a primeira indutora da resposta inflamatória da fase aguda aumentando a diferenciação de células B e a consequente produção de imunoglobulinas (TIZARD, 1998). A IL-6 tem propriedades pró e anti-inflamatórias, com papel protetor no início da inflamação aguda e do choque através da modulação de outras citocinas pró inflamatórias (XING et al., 1998) e atua na transição da fase aguda para a fase de inflamação crônica (JONES, 2005).

A IL-8 é uma interleucina que pertence a família das quimiocinas, é produzida por monócitos, neutrófilos e células natural killer (NK) e é quimiotáxica para neutrófilos, basófilos e células T, e ainda ativa os neutrófilos para degranulação (LIU et al., 1997; TIZARD, 1998). Em adição à atividade quimiotáxica, a IL-8 regula a expressão de moléculas de adesão na superfície celular para ajudar na aderência das células endoteliais e na diapedese dos PMNs (TIZARD, 1998).

A IL-10 tem como principais fontes as células T-helper, células T e B e macrófagos. Exercem a função biológica de inibir complexo de histocompatibilidade maior classe II (MHC II) e a produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-12 e TNF-α e da

quimiocina IL-8, promover a proliferação das células do sítio agredido e produção de anticorpo, e suprimir a imunidade celular (MOSSER & ZANG, 2008).

Tanto o TNF-α como a IL-1 são os maiores modificadores da resposta immune sendo primariamente produzido por macrófagos ativados. Assim como a IL-1, o TNF-α induz a expressão de outras citocinas, aumenta a resposta celular aos fatores de crescimento e induz as vias de sinalização que levam a sua proliferação, pode ainda induzir a apoptose em células infectadas ou tumorais e aumentar a síntese de PGE_2 direta ou indiretamente induzindo a liberação de IL-1, induz a produção das proteínas de fase aguda e a produção de IL-6 (TIZARD, 1998).

As citocinas são proteínas sinalizadoras intercelulares liberadas por células do sistema imune ou por células endometriais. As IL-1β, IL-6 e TNF-α são conhecidos como citocinas pró inflamatórias, pois modulam a resposta inflamatória na fase aguda (FUMUSO et al., 2003). A IL-8 desenvolve função quimiotáxica como mediador pró inflamatório, em contraste a IL-10 tem um pronunciado efeito anti inflamatório pela inibição da produção das citocinas pró inflamatórias (FUMUSO et al., 2006). Nas éguas susceptíveis, a expressão endometrial aumentada das citocinas pró inflamatórias durante o estro (IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-8) e diestro (IL-1β, TNF-α e IL-8), e expressão diminuída da anti inflamatória IL-10 durante o estro contribuem para a susceptibilidade à endometrite (FUMUSO et al., 2003; FUMUSO et al., 2007).

Foi verificado que em um ciclo estral sem infusão uterina o útero das éguas susceptíveis apresenta uma maior expressão durante o estro de IL1-β, IL-6, TNF-α, IL-8, MHC II, PMN e linfócito T e menor de IL-10, já no diestro uma maior expressão de IL1-β, TNF-α, IL-8, IL-10, linfócito T e PMN quando comparadas as éguas resistentes a EPPC. Para as éguas resistentes, a expressão das IL-1β, IL-6 e TNF-α não difere entre o estro e o diestro, porém para as éguas susceptíveis há uma menor expressão de IL-6 e

TNF-α durante o diestro (FUMUSO et al., 2003, FUMUSO et al., 2006, FUMUSO et al., 2007).

Em contraste, 24 h após a IA - mas ainda durante o estro, não se verificou diferenças para IL-1β, IL-6 e TNF-α entre susceptíveis e resistentes, entretanto as éguas susceptíveis tiveram maior expressão de IL-8 e menor de IL-10. Contudo, nesse mesmo período, as éguas resistentes apresentaram maior expressão de IL-1β, IL-6 e TNF-α comparado ao estro em que as éguas não foram inseminadas, fato esse que não ocorre nas éguas susceptíveis, que apesar de apresentarem um nível sempre mais elevado de expressão dessas interleucinas não demonstraram diferença quando se compara os níveis verificados no estro com ou sem a presença de espermatozoides (FUMUSO et al., 2003).

No diestro ocorreu um aumento significativo apenas para a IL-1β nas duas categorias de éguas, sendo que a expressão de IL-1β, IL-8, IL-10, TNF-α, MHC II, linfócito T e PMN foram maiores nas éguas susceptíveis. Após imunomodulação, usando extrato de parede bacteriana, não se verificou diferença na expressão de IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, MHC II, linfócito T e PMN entre as éguas resistentes e susceptíveis tanto no estro como no diestro, mas as éguas susceptíveis apresentaram maior expressão de IL-10 somente durante o estro. Porém, a administração do extrato bacteriano nas éguas susceptíveis na hora da IA resultou em diminuição da expressão de IL-1β e IL-6 durante o estro quando comparadas a elas mesmas sem o tratamento no mesmo período (FUMUSO et al., 2006, FUMUSO et al., 2007).

A expressão gênica endometrial aumentada das citocinas pró inflamatórias foi demonstrada em éguas com endometrite induzida por cobertura em resposta a infusão uterina de plasma seminal, diluidor a base de leite e com gema de ovo e PBS (PALM et

al., 2008), e em éguas com endometrite induzida por inoculação de *Escherichia coli* (CHRISTOFFERSEN et al., 2010, CHRISTOFFERSEN et al., 2012b).

Nehuma diferença no volume, pH, densidade específica ou contagem celular no fluido recuperado do útero das éguas foi verifcado ao se comparar infusões uterinas feitas com PBS, plasma seminal, diluidor a base de leite ou diluidor contendo gema de ovo. Entretanto, menor número de leucócitos (68 ± 5 leucócitos/ campo) no endométrio foi identificado em biópsias pré experimento comparado ao PBS (154 ± 32), plasma seminal (175 ± 22), diluente a base de leite (193 ± 29) e diluente com gema de ovo (113 ± 17). Adicionalmente, todos os tratamentos aumentaram a expressão de IL-1β, IL-6 e TNF-α no endométrio (PALM et al., 2008).

Christoffersen et al. (2010) verificaram em éguas resistentes 3 h após inoculação de *E. coli* um aumento na expressão endometrial de IL-1β, TNF-α e IL-8, porém os níveis se igualaram aos pré inoculação decorridas 12 horas. Igualmente às interleucinas pró inflamatórias, a IL-10 também apresentou um aumento 3 horas após a inoculação, porém muito inferior quando comparado às previamente citadas.

Em um trabalho realizado por Christoffersen et al. (2012a) foi inoculado *E. coli* em éguas, não contaminadas e com condição uterina verificada por biópsia (grau IIb e III de acordo com Kenney e Doig, 1982), e essas foram tratadas com dexametasona (0,1mg/kg) ou com extrato de parede bacteriana (10^5 CFU) em ciclos randomizados num sistema *crossover*. Dessa forma, foi verificado um aumento significativo na expressão gênica de IL-1β e IL-6 após 3 horas da inoculação da *E. coli* quando comparado ao estro sem influência dos tratamentos. Porém, a expressão diminui significativamente (5 vezes para IL-1β e 10 vezes para IL-6) 72 h após o animal ter sido tratado com dexametasona, apesar da expressão gênica endometrial de IL-1β e IL-6 se manter aumentada 72 horas após a inoculação, quando comparada ao nível basal

verificado durante o estro, indicando uma resposta inflamatória ainda ativa nesse momento. O tratamento com extrato bacteriano não mudou a expressão de IL-1β e IL-6 comparado ao grupo tratado com dexametasona ou ao grupo não tratado. A dexametasona induziu uma diminuição da expressão de IL-8 72 horas após o tratamento (7 e 23 vezes, respectivamente para o grupo não tratado e tratado com extrato bacteriano), no entanto nenhuma diferença significativa entre os tratamentos foi observada 3 ou 24 horas após a inoculação de *E. coli*. Uma maior expressão de IL-10 foi observada 3 horas após o tratamento com dexametasona quando comparada ao grupo não tratado (8 vezes) e as 3 horas (5 vezes) e 24 horas (4 vezes) comparado ao grupo tratado com extrato bacteriano. Nenhuma diferença foi observada na expressão gênica de TNF-α após a inoculação de *E. coli* independente do tratamento empregado (CHRISTOFFERSEN et al., 2012a).

Nash et al (2010a) contrariamente verificaram em um *strip* uterino, retirado durante o estro e mantido em cultura, que não há diferença na expressão de IL-8 após 24 horas do contato com sêmen congelado, refrigerado, com espermatozoides lavados ou com plasma seminal; provavelmente porque foram colhidas amostras de úteros previamente selecionados como livres de inflamação aguda ou persistente, enquanto outros estudos utilizaram éguas susceptíveis à EPPC, garantindo assim maiores níveis de IL-8 comparadas as resistentes.

Em outro trabalho de Nash et al (2010b), desafiando o útero com 4 mL de sêmen congelado contendo $600x10^6$ de espermatozoides/mL ou com 4 mL do mesmo diluente pode se verificar que a contagem de neutrófilos aumenta em ambos tratamentos até 24 horas após a IA, sendo a concentração neutrofílica maior no lúmen uterino (citologia por lavado de 50 mL) quando havia espermatozoides. Entretanto, a infiltração de PMNs no estrato compacto (biópsia) permaneceu até 72 horas após a IA. Apesar disto, os

espermatozoides não influenciaram na expressão de IL-8 24 horas após a IA, contrariando novamente os dados da literatura que afirmam o aumento dos níveis dessa quimiocina em experimentos realizados com espermatozoides mortos para indução da resposta inflamatória.

A expressão do RNAm dessas interleucinas aumenta após a inseminação artificial e para as éguas susceptíveis continua aumentada por período de até 8 dias, caracterizando a inflamação uterina persistente. Outra explicação para que as éguas mantenham a persistência da reação inflamatória foi proposta por Fumuso et al. (2007) que verificaram diferença na expressão das interleucinas pró-inflamatória (IL-8) e anti-inflamatória (IL-10) entre as éguas resistentes e susceptíveis a EPPC. Nesse estudo foi constatado que as éguas susceptíveis apresentaram menor expressão de IL-10, atrasando a resolução da inflamação, e maior expressão de IL-8, prorrogando e exacerbando a reação inflamatória pela constante chegada de neutrófilos. As diferentes quantidades endometriais de IL-8 e IL-10 observadas entre as éguas normais e susceptíveis foram mantidas após a IA num ciclo estral sem interferência no útero, mas surpreendentemente desapareceram após o tratamento com o extrato bacteriano durante o diestro, indicando que esse tratamento em éguas susceptíveis pode ajudar a restaurar a homeostase uterina e minimizar os efeitos da endometrite pós cobertura (FUMUSO et al., 2006).

Uma uma nova opção de imunomodular a resposta inflamatória anteriormente a quimiotaxia produzida pelos PMNs ou a expressão dos mediadores inflamatórios pelo controle da expressão dos peptídeos de defesa do hospedeiro, também conhecidos como peptídeos antimicrobianos (AMPs). Além da função antimicrobiana tornou-se evidente que esses peptídeos atuam além, uma vez que eles podem interagir com as células do sistema imune inato, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células epiteliais

aumentando a produção de quimiocinas e citocinas que promovem o recrutamento de leucócitos para o local da infecção ou inflamação. Além disso, esta imunomodulação resulta em respostas imunes inatas que promovem a cicatrização de feridas, iniciam a resposta imune adaptativa, limitam os efeitos potencialmente nocivos da inflamação e promovem o término da infecção (HANCOCK & DIAMOND, 2000, BROWN & HANCOCK, 2006, MOOKHERJEE & HANCOCK, 2007, LAI & GALLO, 2009)

Os AMPs são geralmente definidos como proteínas com menos de 100 aminoácidos que têm atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral) de largo espectro (MOR, 2009). A maioria deles são catiônicos, ou seja, têm uma carga positiva, geralmente entre +2 e +9 em pH fisiológico, devido a um excesso de resíduos de aminoácidos carregados positivamente (arginina e lisina e sob condições ácidas, também histidina). Geralmente, 50% dos aminoácidos são hidrofóbicos e muitas vezes adotam uma estrutura anfipática quando em contato com superfícies lipídicas resultando em uma parte polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica) na sua estrutura (PARK et al., 2004).

As catelicidinas, um dos peptídeos antimicrobianos, foram identificadas no início dos anos 90 na espécie bovina, porém proteínas com apresentações similares acabaram sendo descobertas também em humanos, macacos, camundongos, ratos, coelhos, suínos, ovinos, caprinos, equinos e cães. Os grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos circulantes são a principal fonte de catelicidinas em mamíferos, mas elas também são expressadas em células da pele, superfícies mucosas, epitélio das vias aéreas (BALS et al., 1998), boca, língua, esôfago, vagina e cévix (FROHM et al., 1999), epididímo (MALM et al., 2000) e plasma seminal (ANDERSON et al., 2002).

As catelicidinas são constituídas por um domínio N-terminal, um domínio altamente conservado "*cathelin-like"*na porção mediana da estrutura e um domínio

menos conservado C-terminal que corresponde ao peptídeo na sua forma ativa (NIYONSABA et al., 2002). A região "*cathelin-like"* tem similaridade de 75 a 97% intra espécie (ZANETTI et al., 1995). A espécie equina possui 3 membros na família catelicidina denominados eCATH 1, 2 e 3 (TOMASINSIG & ZANETTI, 2005). O domínio antimicrobiano, o qual é o peptídeo *"cathelicidin"* maduro ou ativo, se torna ativo após clivagem do C-terminal; as catelicidinas são armazenadas como holoproteínas, ou seja, precursores sem atividade antimicrobiana (BRUHN et al., 2011).

A ação antibacteriana dos AMPs ocorre ou por mecanismo membrana ativo ou por translocação através da membrana celular bacteriana. Todos os peptídeos têm que interagir com a membrana celular, independentemente se ocorre a permeabilização ou translocação através da membrana para atingirem o citoplasma e o seu alvo intracelular. A interação inicial entre o peptídeo e as bactérias alvo é pela ligação eletrostática entre o peptídeo carregado positivamente e as moléculas carregadas negativamente na superfície externa da membrana celular bacteriana (tais como os ácidos lipoteicóico de bactérias gram-positivas e os lipopolissacarídeos das bactérias gram-negativas). Dessa forma, os peptídeos penetram a membrana celular bacteriana e se fixam na interface entre as porções hidrofóbicas e hidrofílicas formando poros que quebram a sua integridade física. A outra ação bactericida se dá através da translocação para o meio intracelular agindo na inibição da síntese da parede celular, proteica, do ácido nucleico e da atividade enzimática (BROGDEN, 2005).

A ação fungicida dos AMPs pode ocorrer por permeabilização da membrana celular, ataque direto às mitocondrias (KAVANAGH & DOWD, 2004) ou pela despolimerização do citoesqueleto (KOO et al., 2004).

A atividade antiviral dos AMPs ocorre principalmente sobre os vírus do tipo RNA envelopado e DNA vírus impedindo sua entrada na célula hospedeira por

diferentes mecanismos ou interagindo diretamente com o envelope (JENSSEN et al., 2006).

Investigações da expressão de RNAm das 3 catelicidinas equinas em células mielóides revelaram uma abundante expressão de eCATH 2 e 3 e uma significativa menor expressão relacionada à eCATH 1 (BRUHN et al., 2011). Análises genéticas com mais de 70 cavalos revelaram que 50% deles carregam alelos nulos para eCATH 1. Anticorpos policlonais foram criados contra as 3 catelicidinas usando peptídeos sintéticos e testes realizados provaram a existência dos tipos 2 e 3 em todos os cavalos analisados, porém os anticorpos contra eCATH 1 falharam no seu reconhecimento, deixando suspeitas de que essa forma não possui atividade funcional (SCOCCHI et al., 1999).

Skerlavaj et al. (2001) identificaram a presença de eCATH-3 em secreções inflamatórias indicando que esse peptídeo pode também ser liberado em fluído extracelular evidenciando sua atividade sinérgica com outras moléculas de defesa do organismo hospedeiro.

Os tipos eCATH-2 e eCATH-3 são funcionais e podem ser armazenados em grânulos secretórios dentro de PMNs na forma não processada e podendo ser liberados na ativação neutrofílica, mas também são estocados e liberados de outros tecidos a partir de uma agressão, dessa forma, são efetivamente a primeira defesa do tecido agredido e a ferramenta iniciadora da resposta imune celular. Para o peptídeo assumir uma forma ativa de defesa há a necessidade de uma clivagem em sua estrutura (SCOCCHI et al., 1999; ANDERSON et al., 2002), essa clivagem ocorre em função de uma ação enzimática entre os domínios "*cathelin-like"* e C-terminal em um ambiente inflamado (SKERLAVAJ et al., 2001).

Esses peptídeos de defesa têm o potencial de eliminar ou neutralizar bactérias, tanto as gram-positivas como as gram-negativas, fungos, vírus e parasitas, porém as células hospedeiras são relativamente resistentes a sua atuação pela composição e topologia lipídica da membrana citoplasmática (GRUBOR et al., 2006). Além das catelicidinas atuarem diretamente sobre o organismo estranho apresentam habilidade de regular a expressão de interleucinas pró-inflamatórias contribuindo indiretamente para o recrutamento de células inflamatórias e imunes (TOMASINSIG & ZANETTI, 2005).

Os AMPs podem também influenciar pocessos intracelulares pelas interações com receptores ou sinalizadores moleculares e mediar os efeitos quimiotáxicos e pro inflamatórios (BRUHN et al., 2011). Dentro do grupo desses peptídeos, a família das catelicidinas é que apresentam maior interesse nesse caso, porque além de efetivamente atacar as células estranhas ao indivíduo e apresentar função quimiotáxica para as células do sistema imune inato, é também responsável pela primeira liberação de fatores de quimiotaxia, expressão das interleucinas pró inflamatórias (IL-6 e IL-8) e pela expressão de receptores nas células do sistema de defesa inata do organismo hospedeiro. Em vacas com endometrite pós parto foi verificado um aumento na expressão das interleucinas tipo 6 e 8 e das catelicidinas durante a fase aguda do processo inflamatório (CHAPWANYA et al., 2009).

Vários fatores quimiotáxicos têm sido detectados durante a inflamação em muitos tecidos e órgãos e os AMPs têm sido detectados nestes sítios de inflamação em alta concentração. Dessa forma, esses peptídeos apresentam função reguladora durante a inflamação no controle da expressão das interleucinas pró inflamatórias e podem ainda atuar de maneira direta e específica como um fator quimiotáxico na atração das células do sistema imune (NIYONSABA et al., 2002). Além de participarem no sistema de defesa inata, esses peptídeos também atuam provocando um aumento na produção de

IgG, linfócitos T e $CD4^+$, aumentando, dessa forma, a produção de interleucinas do tipo 5, 6 e 10, ou seja, funcionando como adjuvantes na resposta imune adaptativa e regulando a inflamação a longo prazo (BOWDISH et al., 2005).

Quanto mais severo for o processo inflamatório, maior será a lesão ao tecido agredido e maior será a expressão das interleucinas tipo 6 e 8 e das catelicidinas. A IL-8 coordena o recrutamento de PMNs e outras células da imunidade inata para o sítio inflamado, a IL-6 regula a síntese das proteínas inflamatórias da fase aguda e as catelicidinas são as responsáveis diretas pela regulação da expressão dessas citocinas e são o primeiro fator quimiotáxico que surge após a agressão (CHAPWANYA et al., 2009).

2.3. Influência do plasma seminal

A influência do volume inseminante e, portanto, da quantidade de plasma seminal introduzido no útero sobre as contrações uterinas permanece como fonte de contradição entre diversos autores. Troedsson et al. (1998) constataram um aumento no número total, na amplitude e na duração das contrações uterinas ao compararem o volume inseminante de 80 e de 10 mL. Em contrapartida, Sinnemaa et al. (2005) e Campbell & England (2006) não encontraram diferença nas IA realizadas com 2 ou 100 mL. A redução nas contrações, observada com o volume menor de plasma seminal, pode ser resultante da menor quantidade de PGF2α (BIENLANSKI et al., 1982) e ocitocina (WATSON et al., 1999) presentes no sêmen.

Enquanto o plasma seminal induz uma inflamação endometrial transitória (PALM et al., 2008, FIALA et al., 2007) também modifica a duração da intensidade da resposta imune celular ao espermatozoide. Alguns estudos apontam o plasma seminal

como modulador da resposta inflamatória pós cobertura em éguas, Palm et al. (2006) e Card (2005) observaram uma menor reação inflamatória quando utilizaram sêmen acrescido de plasma seminal, com uma diferença visível apenas 24 horas após a IA enquanto outros mostram que sua adição no momento da inseminação não reduz o número de leucócitos e a fagocitose espermática (TROEDSSON, 1999). Porém, Portus et al. (2005) verificaram que a presença do plasma seminal, apesar de provocar maior reação inflamatória, leva a uma redução na duração do processo inflamatório e maior freqüência de contrações uterinas.

O plasma seminal contém um grande número de proteínas que recobrem a membrana do espermatozoide durante a maturação celular. Diferentes funções destas proteínas e interações complexas entre estas e as subpopulações de proteínas de membrana podem explicar os resultados aparentemente diferentes dos efeitos imunológicos do plasma seminal obtidos nos diversos estudos (TROEDSSON et al., 2000).

Observações sugerem que enquanto o sêmen de determinados garanhões provoca uma reação inflamatória exacerbada, o de outros é responsável por uma resposta inflamatória mais branda independente da égua ser ou não susceptível à EPPC (TROEDDSON et al., 2000, TROEDSSON et al., 2002).

O plasma seminal tem sido considerado como agente supressor da atividade do sistema complemento, e por sua vez da quimiotaxia pelos PMNs e fagocitose atuando como inibidor ou modulador da inflamação uterina (TROEDSSON et al., 2000), uma vez que a opsonização do espermatozoide é dependente do sistema complemento e essa foi reduzida na presença do plasma seminal em estudos *in vitro* (ALAGHAMDI et al., 2004, TROEDSSON et al., 2005). Discordando dessa informação, Palm et al. (2008) verificaram que além de provocar grande infiltração neutrofílica no endométrio, o

plasma seminal ainda é responsável por aumentar a expressão das interleucinas pró inflamatórias (IL-1β e IL-6).

A duração dessa inflamação é mais curta quando o plasma seminal está presente na dose inseminante do que quando ele é removido ou substituído por diluente (TROEDSSON et al., 2002). O número de PMNs encontrado no útero 24 horas após a IA foi significativamente menor quando o plasma seminal foi mantido na inseminação. Ao se realizar uma IA somente com plasma seminal foi detectada uma grande infiltração de PMNs no estrato compacto do endométrio, porém a limpeza uterina foi superior quando o plasma seminal estava presente (TROEDSSON et al., 2008).

O conhecimento dos fatores ou substâncias que parecem desestabilizar ou proteger a membrana dos espermatozoides é de extrema importância, uma vez que a integridade da mesma é fundamental para o funcionamento adequado do gameta masculino (PARKS & GRAHAM, 1992). Diante disso, os elementos bioquímicos e proteicos do plasma seminal e da membrana espermática têm sido correlacionados à fertilidade, as proteínas e polipeptídios constituem os componentes de mais alto peso molecular do plasma seminal, mas as informações sobre a sua origem, estrutura e funções ainda são limitadas (McDOWELL et al., 1996).

Outra aparente função do plasma seminal seria proteger o espermatozoide de ser fagocitado e destruído pelos PMNs. Quando as éguas são cobertas pela segunda vez dentro de 24 horas, o sêmen da segunda IA é introduzido em um ambiente inflamado que se torna deletério a sua motilidade. Dados sugerem que o plasma seminal protege seletivamente os espermatozoides viáveis, mas não os mortos, de se ligarem e serem fagocitados pelo PMNs (TROEDSSON et al., 2000, TROEDSSON et al., 2005). Recentemente, Doty et al. (2011) relataram que a CRISP 3 é a responsável pela proteção dos espermatozóides viáveis do ataque dos PMNs.

Em humanos, foi verificado que a catelicidina presente no plasma seminal é importante para proteção das células espermáticas em um ambiente não favorável e na manutenção de um ambiente estéril durante o transporte espermático e a fertilização (ANDERSON et al., 2002).

No caso de humanos, as catelicidinas do plasma seminal reduzem o crescimento bacteriano por até 24 horas quando estão em alta concentração e intensificam a resposta inflamatória pela atração das células de sistema imune inato (SORENSEN et al., 2003). Foi estabelecido, para humanos, que a concentração desse peptídeo no plasma seminal é cerca de 40 a 140 vezes maior do que a verificada na corrente sanguínea, sendo um fator externo altamente influente na resposta inflamatória a presença dos espermatozoides (ZANETTI, 2004). Dessa forma, sua concentração no plasma seminal pode ser responsável pela variação individual entre os machos na intensidade da resposta inflamatória independente da condição uterina da fêmea.

Não foram encontrados na literatura trabalhos referentes a presença de catelicidinas no plasma seminal de equinos. Os mecanismos de expressão das interleucinas nos casos de endometrite em éguas são pouco explorados e o entendimento dos fatores uterinos responsáveis pelo início e término da resposta inflamatória após a cobertura são fundamentais para imunomodular a inflamação e otimizar a atividade reprodutiva das éguas susceptíveis a EPPC.

Trabalhou-se com a hipótese de que com a identificação e a quantificação das catelicidinas no plasma seminal dos garanhões será possível em experimentos futuros identificar os animais que provocam uma maior reação inflamatória no útero das éguas, caracterizar a fração proteica do plasma seminal que induz a reação inflamatória quando em contato com a mucosa uterina e identificar um outro agente também responsável pela proteção conferida aos espermatozoides viáveis possibilitando que a fertilização

ocorra, mesmo que seja em um ambiente desfavorável. Distúrbios na expressão das interleucinas no útero das éguas e das catelicidinas no plasma seminal dos garanhões podem ser responsáveis pela magnitude e persistência da resposta inflamatória uterina decorrente do contato dos espermatozóides com o útero; a partir de seu controle seria possível minimizar o estímulo inflamatório inicial e possibilitar ao útero das éguas susceptíveis a EPPC uma maneira de minimizar a intensidade e a persistência da inflamação e com isso aumentar as taxas de fertilidade.

3. OBJETIVOS

- Verificar a presença das catelicidinas no plasma seminal de garanhões.

- Caracterizar a resposta imune uterina após infusão de plasma seminal e inseminação artificial pela expressão de interleucinas pró e anti-inflamatórias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Garanhões

4.1.1. Seleção de garanhões e colheita e processamento do plasma seminal

Para se confirmar a presença das catelicidinas no plasma seminal foram realizadas duas colheitas de sêmen de 15 garanhões adultos da raça quarto de milha de fertilidade conhecida por meio de vagina artificial modelo Botucatu (n=30) e imediatamente após a colheita a fração gel do ejaculado foi separada por filtração. Assim sendo, sem adição de diluente, uma alíquota de cada ejaculado foi então centrifugada a 600 x *g* por 10 minutos em temperatura ambiente para formação e separação do pelete de espermatozóides o qual foi descartado.

Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e filtrado (0,22µm Durapore® PVDF membrane, millipore) para eliminação de contaminações. Ao volume final foi acrescido uma solução de inibidores de proteases (Protease Inhibitor Cocktail®, sigma-aldrich) conforme especificações do fabricante na concentração de 0,5µL/mL. O plasma seminal foi envasado em criotubos (Corning® 2mL) livres de RNAse e DNAse e transportado em botijão criogênico tipo *dry-shipper* até o laboratório onde foram armazenados até o processamento congelados à -20°C.

4.1.2. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

As amostras de plasma seminal de todos os garanhões (n=15) foram submetidas à técnica de eletroforese unidimensional desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A análise SDS-PAGE foi feita em duplicata para todas as amostras. Quando não especificado, os reagentes mencionados foram adquiridos da empresa GE Healthcare (PlusOne e USB).

Visando o ajuste da quantidade de proteína nas amostras destinadas à corrida de eletroforese, a quantidade de proteína total foi previamente determinada pelo método de BCA (ácido bicinconínico) (BCA Protein Assay Kit, Pierce), seguindo as instruções do fabricante, e usando espectrofotômetro (Ultrospec 200®, Pharmacia Biotech). Posteriormente, a quantidade total de proteína foi ajustada por diluição diferencial utilizando água MilliQ, resultando em uma concentração final de 6 mg/mL em todas as amostras.

As amostras de plasma seminal ajustadas foram então diluídas em tampão da amostra (60 mM Tris-HCl pH 6,8; 50% glicerol, 2% SDS, 23 mM 2-mercaptoetanol, 0,1% bromofenol azul) utilizando a proporção de 1:4 (tampão:amostra) e aquecidas a temperatura de aproximadamente 100ºC durante 7 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, uma alíquota de 5 µL (24 µg de proteína total) de cada amostra foi aplicada lentamente em canaletas formadas pelo gel de empilhamento (5% de poliacrilamida). O padrão de peso molecular (Kaleidoscope Polypeptide Standards, 3,6 a 31.7 kDa, Cat. 161-0325, Bio-Rad) foi aplicado em duas canaletas de cada gel. A corrida eletroforética foi realizada em gel separador de 15% de poliacrilamida em tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina e 0,1% SDS) e utilizando sistema vertical (mini-cuba vertical, MiniVE®, Amersham Biosciences). Uma corrente elétrica constante de 15 mA/ gel e voltagem máxima de 260-290 V foi aplicada por

aproximadamente 90 minutos utilizando fonte elétrica bipolar (EPS 300 Power Supply, Amersham Biosciences).

Os géis foram corados em solução de 45% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 0,1% de Coomassie Azul (Coomassie® Brilliant Blue R-250) durante 30 minutos. Posteriormente, as imagens dos géis foram digitalizadas e analisadas utilizando o s*oftware* ImageMaster® 1D (Amersham Biosciences) para determinação do peso molecular e da densidade óptica integrada (IOD) de cada banda proteica presente no gel.

4.1.3. Dot-blotting

Para realização do teste foram sintetizados 3 peptídeos cujas sequências de aminoácidos estão apresentadas na **Tabela 1** e contra cada um desses peptídeos foram produzidos antisoros policlonais em coelho dos quais foi purificado a fração IgG fornecido a 2mg/mL pela empresa Rheabiotech (Campinas, São Paulo, Brasil).

Tabela 1. Sequência de aminoácidos dos peptídeos sintéticos das catelicidinas equinas.

Antígeno	Sequência	Número de acesso
eCATH 1	KRFGRLAKSFLRMRILLPRRKILLAS	GenBank: AJ224927.1
eCATH 2	KRRHWFPLSFQEFLEQLRRFRDQLPFP	GenBank: AJ224928.1
eCATH 3	KRFHSVGSLIQRHQQMIRDKSEATRH	GenBank: AJ224929.1

Foi realizado o método de Dot blot direto utilizando o *"Immun-Blot® Assay Kit"*. Para a realização da técnica, as membranas de nitrocelulose de 0,2µm de poro com

dimensão de 0,5 x 6,0 centímetros foram mergulhadas em "*Tris Buffered Saline"* (TBS - 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) e colocadas por 10 minutos sob agitação e, após retirada desse tampão, foram colocadas a 37ºC por 30 minutos para secagem. A seguir, foram aplicadas sobre a mesma 1µL de concentrações variadas do antígeno sintético (1, 50, 100, 200ng) e 1µL de cada amostra para ser adsorvida na membrana, que por sua vez foi então incubada por 30 minutos a 37ºC. Em seguida, a membrana com os antígenos foi submersa em solução de bloqueio (5% gelatina-TBS) e incubada por 16 horas a 37ºC para impedir que os anticorpos da próxima etapa se ligassem diretamente à membrana. Após a incubação, a membrana foi lavada 3x com TTBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) em agitação suave à temperatura ambiente durante 5 minutos e o anticorpo anti-catelicidinas previamente diluído (eCATH1 = 1/100, eCATH2 = 1/250 e eCATH3 = 1/300) em 1% gelatina-TBS foi aplicado sobre o conjunto membrana-antígeno, e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação.

Terminada a incubação, a membrana foi lavada 2x com solução salina de citrato acrescida de tween 20 (*Tween Citrate Buffered Saline,* TCBS - 20 mM citrate, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 5.5) em agitação suave à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após esse período, o conjugado (proteína G marcada com peroxidase), diluído 1:3.000 no tampão TCBS contendo 1% de gelatina, foi aplicado e mantido sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora. Ao final a membrana foi lavada novamente com TBS, 5x em agitação suave à temperatura ambiente, durante 5 minutos, seguida da aplicação do cromógeno-substrato (4-chloro-1-naphthol e peróxido de hidrogênio, respectivamente), o qual ficou sob agitação suave à temperatura ambiente durante 30 minutos, e seu bloqueio com água milliQ durante 10 minutos para finalização do teste, obsevação das manchas (dots) e leitura dos resultados. A membrana com os dots foi

escaneada e as imagens foram lidas pelo programa PDQuest^{TM} Basic 2D Gel Analysis SW (2005, version 8.0.1, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Os resultados obtidos com o antígeno sintético, com quantidades conhecidas, foram usados para a construção de uma curva padrão pela plotagem dos dados em um gráfico de dispersão, no qual X representou o valor de leitura do teste e Y a quantidade de antígeno utilizada. Foi obtida uma função não linear logarítmica para os Ag 2 (R^2 = 0,9987) e 3 (R^2 = 0,9984) e exponencial para o Ag 1 (R^2 = 0,9960). Para a realização da regressão linear, ambas as funções logarítmica e exponencial foram linearizadas. A função logarítmica Y = a + b.ln x foi transformada na função linear y = a + b.ln x, transformação de x_i em ln x_i. Por sua vez a função exponencial Y = a.e^{bx} foi transformada na função linear ln y = ln a + bx, pela transformação de yi em ln yi. Desta forma, os resultados obtidos na leitura foram utilizados para a determinação da quantidade de proteína presente em cada amostra. A curva de quantificação foi construída individualmente baseada em concentrações pré-determinadas do antígeno sintético para cada alvo desejado (1; 50; 100 e 200µg) conforme a Figura 1.

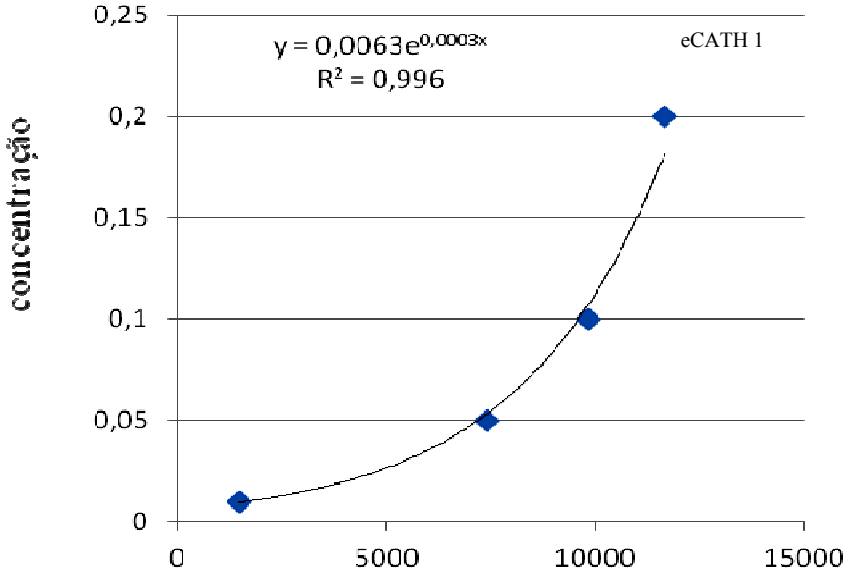


Figura 1a. curva exponencial gerada a partir dos resultados obtidos para o antígeno sintético eCATH 1.

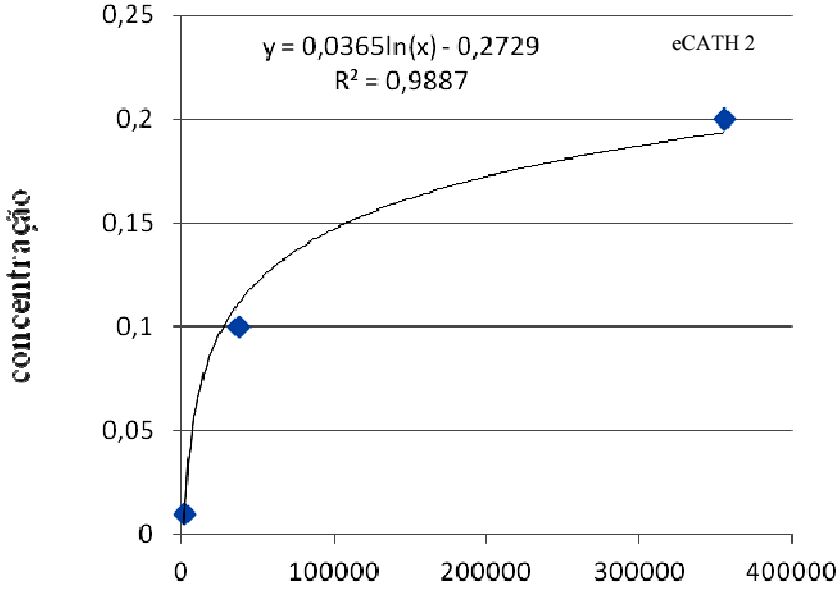


Figura 1b. Curva logarítmica gerada a partir dos resultados obtidos para os antígenos sintéticos eCATH 2.

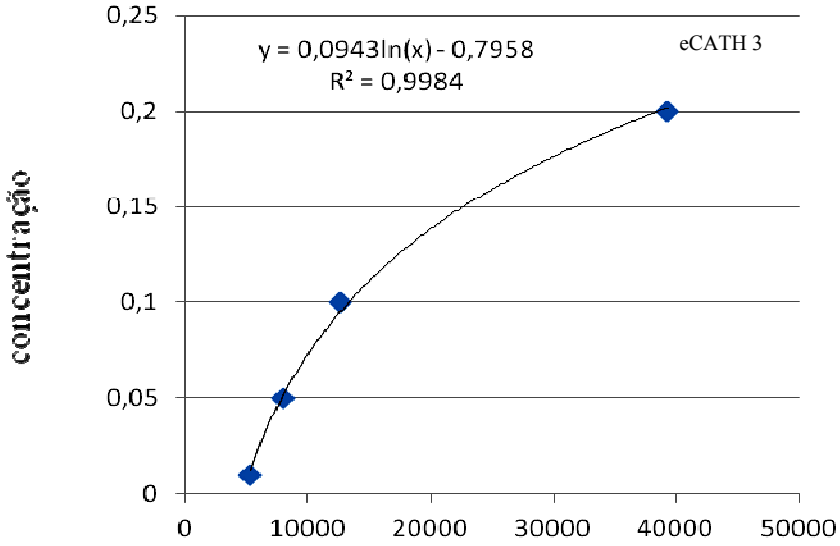


Figura 1c. Curva logarítmica gerada a partir dos resultados obtidos para os antígenos sintéticos eCATH 3.

4.2. Éguas

4.2.1. Seleção dos animais

Foram utilizadas 10 éguas sem raça definida e sem qualquer tipo de alteração anatômica no aparelho reprodutivo, com idade inferior a 10 anos, citologia negativa para inflamação ativa (< 3% de neutrófilos) durante o estro, sem histórico de baixa fertilidade e sem acúmulo de líquido pós IA que persista além de 48 horas; e 10 éguas susceptíveis a EPPC, selecionadas pelo histórico de baixa fertilidade e com idade acima de 14 anos, citologia negativa para inflamação ativa (< 3% de neutrófilos) durante o estro, útero projetado na cavidade abdominal, acúmulo de líquido intra-uterino e citologia de inflamação ativa pós IA persistente por mais de 48 horas após a cobertura.

As éguas pertencentes à FMVZ UNESP Botucatu permaneceram alojadas no posto de monta na fazenda lageado. Durante o experimento foi utilizado um único cavalo, garanhão pertencente e alojado nas dependências da FMVZ UNESP Botucatu, altamente utilizado em diversos experimentos e sabidamente de qualidade espermática e fertilidade altas.

Foram colhidos embriões de todas as éguas 8 dias após a ovulação via lavado uterino transcervical com sonda usando ringer lactato, sendo portanto considerado positivo para fertilidade quando ocorrida a recuperação embrionária. Após o lavado uterino foi realizada a aplicação intramuscular de 0,250 mg de cloprostenol sódico para se iniciar novo ciclo estral.

4.2.2. Colheita de sêmen e preparo das doses

Foi realizada colheita de sêmen com auxílio de uma vagina artificial (modelo Botucatu), regulada individualmente para esse garanhão no momento da colheita. Imediatamente após a obtenção do sêmen e a retirada da fração gel por filtração foram utilizadas 2 metodologias de preparo dependente do ciclo estral das éguas.

No ciclos estrais que foram realizadas inseminações artificiais, imediatamente após a remoção da fração gel foi realizada uma diluição desse sêmen na proporção de 1:1 com diluente a base de leite desnatado (Botu-semen®, Botupharma, Brasil) sempre foi utilizado o mesmo diluente para todas as amostras de sêmen coletadas. Após essa diluição prévia, a concentração foi mensurada com uso da câmara de Neubauer e foi separada uma dose contendo 1 x 10^9 espermatozoides totais. A motilidade espermática foi mensurada com uma gota de 10 µL de sêmen diluído colocada em câmara de Makler pré-aquecida (100 µm de profundidade) a 38°C e avaliada por análise computadorizada (CASA, HTM – IVOS 12; Hamilton Thorne Research, Beverly, MA) no modo ajustado para eqüinos. Após as análises laboratoriais a dose inseminante foi rediluída para o volume final de 20 mL no intervalo de concentração espermática para transporte de 25 a 50 milhões de espermatozoides/ mL (VARNER et al., 1987).

Nos ciclos estrais que foram realizadas infusões uterinas de plasma seminal uma alíquota do ejaculado sem acréscimo de diluente foi submetida à centrifugação a 600 x g por 10 minutos em temperatura ambiente para formação e separação do pelete de espermatozóides o qual foi descartado. Após essa primeira centrifugação o sobrenadante foi retirado e passado por uma filtração de 0,22µm (Durapore® PVDF membrane, millipore) para eliminação de espermatozóides restantes até obtenção do volume final de 20 mL, equiparando dose de infusão e dose inseminante.

4.2.3. Controle estral, indução de ovulação, ciclo controle ou infusões uterinas ou IA

Todas as éguas tiveram seus ciclos estrais acompanhados por palpações retais e ultrassonografia e randomicamente passaram pelos 3 tratamentos propostos a seguir.

Um ciclo estral fisiológico, ou seja, acompanhamento da ovulação sem infusão uterina de plasma seminal ou IA, sendo por isso considerado como ciclo controle (T1); um ciclo com infusão uterina de 20 mL de plasma seminal (T2) e um ciclo no qual foi realizada a inseminação artificial com 20 mL de sêmen fresco diluído (T3).

Para isso, ao se detectar um folículo de 35mm e um edema uterino de grau 2 (escala de 1 a 3) as éguas tiveram as ovulações induzidas com 1mg de acetato de deslorelina por via intramuscular e as éguas foram então inseminadas ou infundidas com plasma seminal apenas uma vez por ciclo com o volume total previamente estabelecido e nos ciclos em que a ovulação não ocorria dentro do período desejado (entre M1 e M2) as colheitas eram descartadas e o ciclo estral desconsiderado.

4.2.4. Colheita e processamento do material uterino

4.2.4.1. Momentos de coleta de material

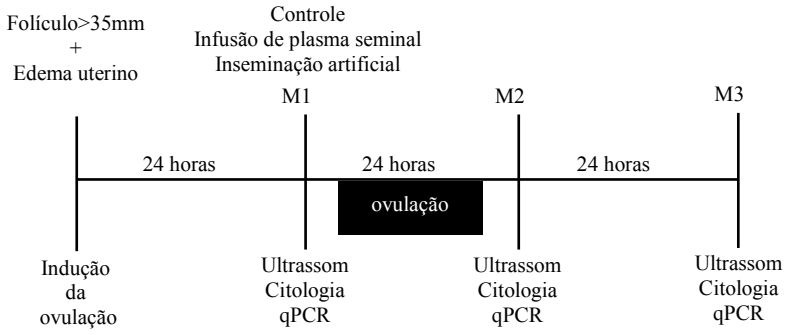
Momento 1 (M1): vinte e quatro horas após a indução da ovulação, ou seja, imediatamente anterior a infusão de plasma seminal ou da IA, dependendo de qual tratamento seria usado no ciclo estral. Nesse momento o útero das éguas não sofreu agressão pela presença de qualquer componente do ejaculado e portanto não deveriam apresentar nenhum tipo de alteração decorrente de um processo inflamatório, é importante esclarecer que mesmo quando são utilizados vários ciclos estrais consecutivos a condição uterina das éguas retorna ao normal no transcorrer do estro subsequente, podendo ser considerado como um momento fisiológico de normalidade relacionado as imagens ultrassonográficas e achados de citologia.

Momento 2 (M2): Vinte e quatro horas após o momento 1, momento que muitos autores consideram como o ponto de divergência da classificação das éguas como

susceptíveis à EPPC, ou seja, momento onde nas éguas resistentes o processo inflamatório fisiológico está prestes a se resolver e nas éguas que demonstram qualquer tipo de falha no "*clearance"* uterino há a persistência da resposta imune celular de forma contínua e ativa com altas concentrações no lúmen uterino de células de defesa e com expressão prolongada de mediadores inflamatórios e fatores quimiotáticos.

Momento 3 (M3): quarenta e oito horas após o momento 1, momento considerado por diversos autores como máximo para verificação de um processo inflamatório ativo. Passadas 48 horas da cobertura a resposta inflamatória nas éguas resistentes a EPPC está finalizada e nas éguas susceptíveis ainda é um processo ativo e portanto ainda ocorre a produção e liberação dos fatores de quimiotaxia.

Em todos os ciclos estrais colhidos as éguas apresentaram ovulações entre os momentos M1 e M2. Quando foi necessária a infusão uterina de plasma seminal ou a inseminação artificial essas foram realizadas no momento 1 imediatamente após a colheita dos dados referentes à condição uterina (imagem ultrassonográfica) e do material (células para qPCR e citologia uterina). As imagens ultrassonográficas analisadas, as amostras para citologia uterina e para qPCR foram colhidas nos mesmos momentos acima descritos como M1, M2 e M3 conforme o esquema.



4.2.4.2. Ultrassonografia uterina

O exame ultrassonográfico foi realizado com transdutor linear de freqüência de 5MHz (Pie Medical, Aquila, Esaote). Todo o útero foi pesquisado para presença de acúmulo de líquido nos três momentos previamente estabelecidos e será levado em consideração o *status* uterino no momento da inseminação artificial, e assim sendo, as éguas não devem apresentar nenhum traço de acúmulo de líquido ou achados de citologia que indiquem um processo inflamatório instalado para que se tenha garantia de que os animais selecionados apresentem características fisiológicas normais, uma vez que a inflamação em questão somente se estabelece após a presença dos espermatozoides no útero e não em decorrência de algum possível processo infeccioso. As medições foram realizadas na área da bifurcação entre o corpo e os cornos uterinos e a coluna de líquido mensurada de acordo com a altura que essa apresentou.

4.2.4.3. Citologia uterina

Seguidas as palpações retais e após a higienização da região perineal foi realizada a colheita da citologia uterina exfoliativa, as quais foram feitas com auxílio de um aparelho para coleta de citologia uterina equina que tinha a função de proteger a escova ginecológica do contato com o ambiente vaginal e cervical da fêmea e facilitar sua entrada no útero. Esse procedimento foi realizado 2x, sendo que uma escova foi mergulhada em 1 mL de RNAlater® (sigma-aldrich) em um microtubo e armazenado de acordo com as especificações do fabricante a -20ºC para a realização do qPCR. A segunda escova ginecológica foi utilizada para confecção das lâminas e posterior análise citológica. As lâminas foram secas ao ar e coradas em Panótico Rápido (Laborclin, Brasil). A leitura das amostras foi feita em microscopia óptica em aumento de 1000x (imersão) considerando a relação entre o número de neutrófilos e as células

endometriais, sendo examinadas um total de 200 células por lâmina de forma aleatória e o resultado expresso em porcentagem de neutrófilos.

4.2.5. qPCR

Após remoção do RNAlater o RNA foi extraído das amostras com *"total RNA purification kit®"* (Norgen Biotek Corp.) de acordo com as especificações do fabricante, e posteriormente tratado com DNAse livre de RNAse *"amplification grade AMPD1-kit®"* (Sigma-Aldrich) conforme instruções do fabricante. Para a obtenção de cDNA foi utilizada a enzima Superscript III® (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, 5 µL do RNA tratado com DNAse foi misturado a 1 µL de *"Random Primer"* (250ng), 0,5 µL de dNTP (10mM) e 6,5 µL água nuclease free e aquecidos a 65 °C por 5 minutos. Imediatamente após os seguintes reagentes foram adicionados: 4 µL de *"Buffer first-strand 5X"*, 1 µL de DTT (0,1M), 1 µL de RNAse out (40U/mL) e 1 µL de superscript (200U/mL); a mistura foi incubada em 25 °C/5 min, 50°C/60 seg e 70°C/15 seg, o volume final de 20 µL foi estocado a - 20 °C até ser usado para a qPCR.

A amplificação por qPCR dos RNAm codificantes de algumas citocinas foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores – primers (Sigma-Aldrich) cujas sequencias encontram-se na Tabela 2 e previamente descritos por Garton et al. (2002).
A mistura para qPCR consistiu de 2 µL de cDNA, 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix, 2X (Promega), 900 nM de cada primer para o alvo escolhido, 0,2µL de CXR Reference Dye® (30 µM) (Promega) e água nuclease free para um volume final de 20 µL. β-actina, GaPDH e G3PDH foram testados como genes endógenos, porém, somente o mais estável foi utilizado (GaPDH). Cada amostra foi analisada em duplicata e o controle

negativo foi água nuclease free substituindo o cDNA das amostras testadas na formulação acima descrita. Para a realização da análise foi utilizado SDS 7300 (Applied Biosystems, EUA) e as condições da reação foram as seguintes para todos alvos: 95 °C/2 min para a desnaturação inicial, amplificação em 40 ciclos de 95 ºC/15 seg (desnaturação), 60 ºC / 1 min (anelamento e extensão), e a curva de dissociação nas seguintes condições: 95 ºC/15 seg, 60 ºC/30 seg e 95 ºC/15 seg. Os resultados da amplificação foram avaliados através da curva de dissociação e relacionados a uma curva-padrão (R^2:0,99 e Slope: 3,52) de uma amostra previamente escolhida; dessa forma, obteve-se a quantificação relativa das amostras testadas (Figura 2). Para a menor diluição de cDNA padrão foi determinado o valor relativo de 0,1 e, seguindo a mesma razão de diluição, os outros três pontos foram de 1, 10 e 100. O valor relativo corrigido foi determinado pelo método da curva padrão após normalização com GaPDH conforme descrito por Larionov et al. (2005) usando o software SDS version 1.2.3 ("Sequence Detection Systems" 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System – Applied Biosystems).

Todas as amostras que apresentaram cTs acima de 34 foram consideradas como não detectadas e excluídas das análises estatísticas.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos que codificam as proteínas alvo. Primer forward e reverse das proteínas alvo.

Primer	Sequência 5' – 3'
IL-1B equi-F	TGAAGGGCAGCTTCCAAGAC
IL-1B equi-R	GGGAGAATTGAAGCTGGATGC
IL-6 equi-F	CCCCTGACCCAACTGCAA
IL-6 equi-R	TGTTGTGTTCTTCAGCCACTCA
IL-8 equi-F	CGGTGCCAGTGCATCAAG
IL-8 equi-R	TGGCCCACTCTCAATCACTCT
IL-10 equi-F	GTCGGAGATGATCCAGTTTTACCT
IL-10 equi-R	AGTTCACGTGCTCCTTGATGTCT
TNF-α equi-F	GCTCCAGACGGTGCTTGTG
TNF-α equi-R	GCCGATCACCCCAAAGTG
G3PDH equi-F	GGTGGAGCCAAAAGGGTCAT
G3PDH equi-R	TTCACGCCCATCACAAACAT
GaPDH equi-F	GGCAAGTTCCATGGCACAGT
GaPDH equi-R	CACAACATATTCAGCACCAGCAT
B-ACT equi-F	CCGGGACCTGACGGACTA
B-ACT equi-R	CCTTGATGTCACGCACGATT

IL= interleucinas; G3PDH, GaPDH, βACT = genes endógenos.

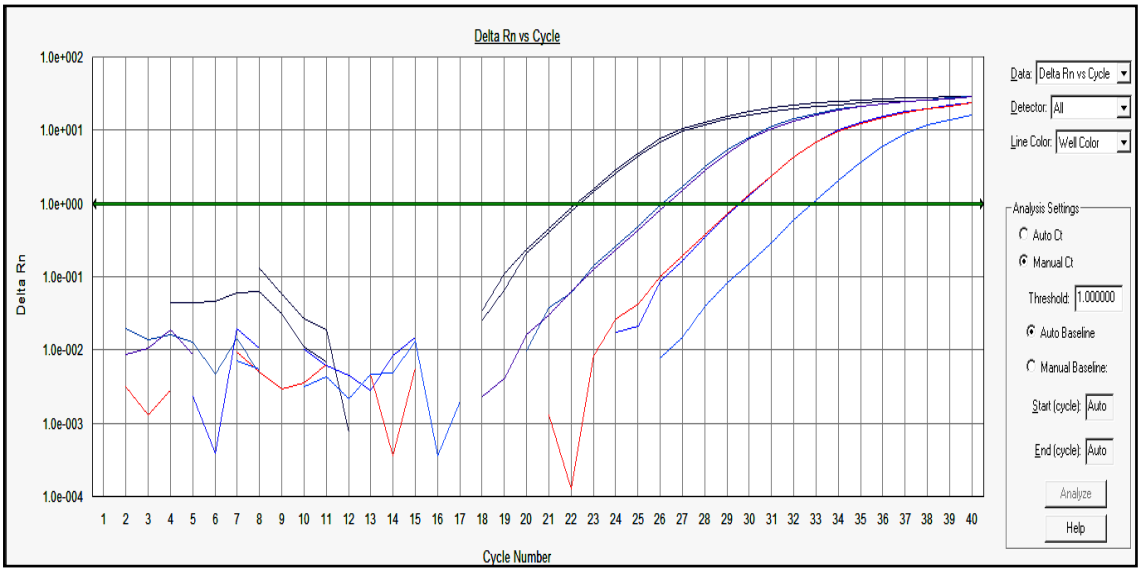


Figura 2a. Representação gráfica da curva de amplificaçãodo gene GaPDH e as diluições relativas (100;10;1 e 0,1) da amostra de referência.

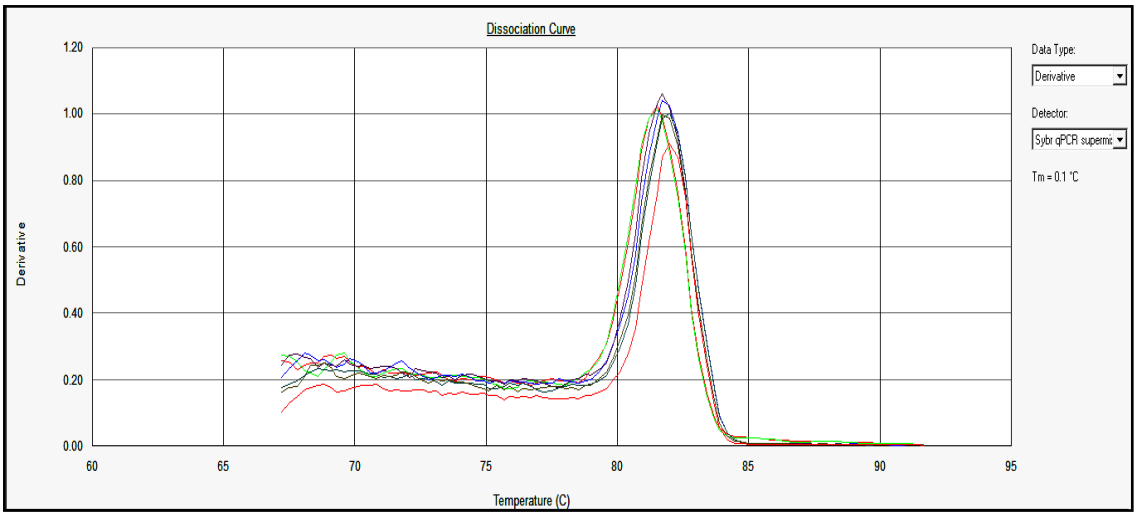


Figura 2b. Representação gráfica da curva de dissociação das amostras da curva relativa padrão do gene GaPDH da amostra de referência.

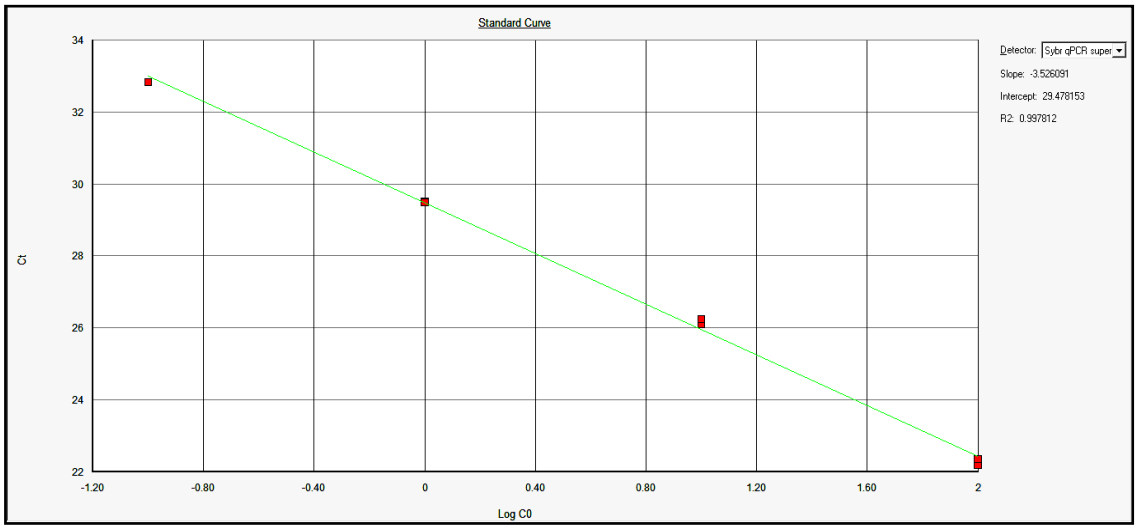


Figura 2c. Representação gráfica da curva padrão da amostra de referência onde no eixo x encontra-se o log da concentração relativa e eixo y o valor de cT (threshold cycle), r^2:0,99 e Slope: 3,52 demonstrando eficiência de 92,3%.

4.3. Análise Estatística

Para os parâmetros medição da coluna de líquido acumulado na área da bifurcação uterina foi realizada análise de covariância para as respostas nos tempos 24 e 48 horas para estudar o efeito do plasma seminal e da inseminação artificial no útero das éguas, e da classe das éguas (resistentes e susceptíveis), considerando a resposta no momento 1 como variável auxiliar.

Para se analisar os dados obtidos a partir do exame citológico foi usado ANOVA e depois Tukey quando houve diferença estatítica, utilizando as medidas do momento 1 como variável auxiliar.

Os dados da qPCR foram apresentados como medianas e variância da expressão de mRNA relativo dentro de cada grupo (n = 10). Diferenças entre grupos pareados (controle *versus* plasma seminal e plasma seminal *versus* inseminação artificial e controle *versus* inseminação artificial) foram analisados com o teste de Wilcoxon. Diferenças entre os grupos não pareados (éguas susceptíveis *versus* éguas resistentes à EPPC) foram analisados com o teste de Mann-Whitney U-test. O teste de correlação não paramétrico de Spearman foi utilizado para análises de correlação entre a expressão do mRNA das citocinas.

Todos os parâmetros foram analisados com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

A concentração total de proteína presente no plasma seminal dos garanhões variou de 6,27 a 28,66 mg/mL, apresentando uma média de 14,24 ± 7,68 mg/mL (Tabela 3). Considerando os resultados obtidos para todos os animais, foram detectadas 24 bandas proteicas diferentes, com peso molecular variando de 5,2 a 51,7 kDa. Contudo, levando em conta a quantidade de banda proteica detectada por animal, houve uma variação de 15 a 20 bandas por garanhão. No total, 12 bandas proteicas foram visualizadas em todas as amostras de plasma seminal avaliadas. É importante ressaltar que, com exceção das bandas proteicas de 20,8 ± 0,46 kDa e 16,2 ± 0,30 kDa que apresentaram uma média de 0,74 ± 0,29 μg e 0,54 ± 0,01 μg de proteína, respectivamente, as bandas proteicas não detectadas em todos os animais apresentaram concentração proteica média abaixo de 0,5 μg. Desta forma, a não detecção de algumas bandas proteicas pode ser atribuída ao fato de que em alguns animais essas bandas apresentarem quantidades inferiores ao limiar de sensibilidade da técnica de coloração utilizada, e não especificamente a ausência completa da mesma.

Na análise da Figura 3, é possível notar que as bandas de menor peso molecular apresentam maior quantidade de proteína. Aproximadamente 83% da quantidade de proteína foi detectada entre 5,2 e 23,7 kDa. A banda com maior quantidade de proteína foi a 17,5 ± 0,22 kDa com média de 4,53 ± 0,95 μg, estando presente em todos os animais. Por sua vez, a banda com menor quantidade de proteína foi a 31,2 ± 0,57 kDa com 0,15 ± 0,13 μg de proteína, detectada em apenas nove animais.

Tabela 3. Concentração total de proteína nas amostras de plasma seminal de garanhões (n=15) e quantidade de proteína nas bandas proteicas de interesse (bandas 1, 2 e 3).

Garanhão	Concentração de proteína total (mg/mL)	Quantidade de proteína (µg)		
		Banda 1 (17,5 kDa)	Banda 2 (16,2 kDa)	Banda 3 (14,8 kDa)
1	24,08	5,81	ND	1,37
2	11,03	5,02	ND	0,97
3	28,66	6,69	ND	1,75
4	6,98	4,71	ND	1,20
5	6,27	4,82	ND	1,81
6	10,42	5,70	ND	2,45
7	22,02	4,64	ND	1,78
8	8,07	3,80	0,54	2,15
9	7,12	4,38	ND	1,43
10	8,21	4,10	ND	1,13
11	20,21	3,54	ND	2,04
12	9,41	3,83	ND	1,70
13	13,30	3,91	ND	1,85
14	25,65	3,49	ND	1,57
15	12,17	3,55	ND	1,58
Média ± DP	**14,24 ± 7,68**	**4,53 ± 0,95**	**0,54***	**1,65 ± 0,40**

ND = banda proteica não detectada, * cálculo feito com base em apenas 1 animal

As análises de SDS-PAGE revelaram a existência de 3 bandas proteicas dentro do intervalo de peso molecular previamente citado na literatura para as catelicidinas (14,9 a 19,3 kDa). Essas bandas de interesse foram nomeadas didaticamente como:

banda 1 (17,5 ± 0,22 kDa), banda 2 (16,2 ± 0,30 kDa) e banda 3 (14,8 ± 0,09 kDa) (Figura 4). A quantidade de proteína dessas bandas para cada animal está apresentado na Tabela 3. De forma interessante, enquanto as bandas proteicas 1 e 3 foram localizadas em todas as amostras de plasma seminal, a banda proteica 2 foi visualizada somente em um animal.

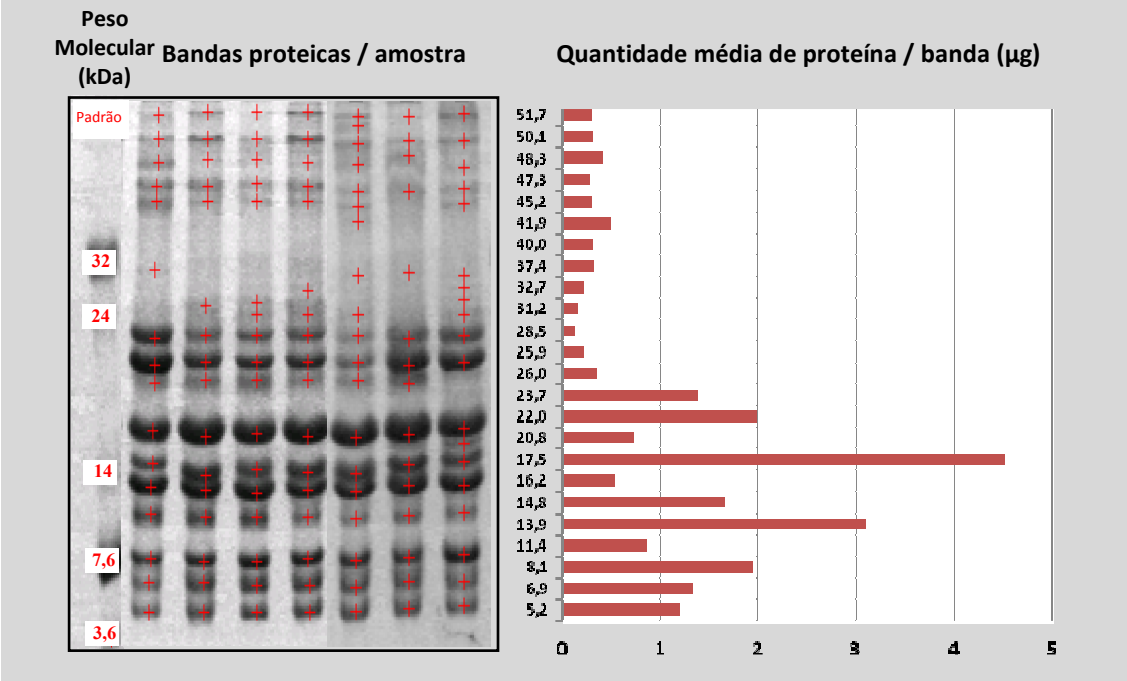


Figura 3. Gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) de amostras de plasma seminal de garanhões corado com Coomassie Azul 0,1% (à esquerda). Representação gráfica da quantidade média de proteína por banda detectada em todas as amostras de plasma seminal (à direita).

Figura 4. Localização das bandas proteicas de interesse (peso molecular similar às catelicidinas) no gel de eletroforese (SDS-PAGE) de plasma seminal equino corado com Coomassie Azul 0,1%.

5.2. Dot-blotting – concentração das catelicidinas no plasma seminal de garanhões

Os resultados da quantificação de catelicidinas estão apresentados na Tabela 4 e na Figura 5. As amostras de plasma seminal dos garanhões que apresentaram quantidades dos peptídeos alvo menores do que 10ng ou maiores do que 200ng não puderam ser corretamente dosadas, pois estavam fora do intervalo de confiança da curva previamente estabelecida. Os "dots" gerados pelo controle positivo - antígeno sintético - foram visualizados como exposto na Figura 5.

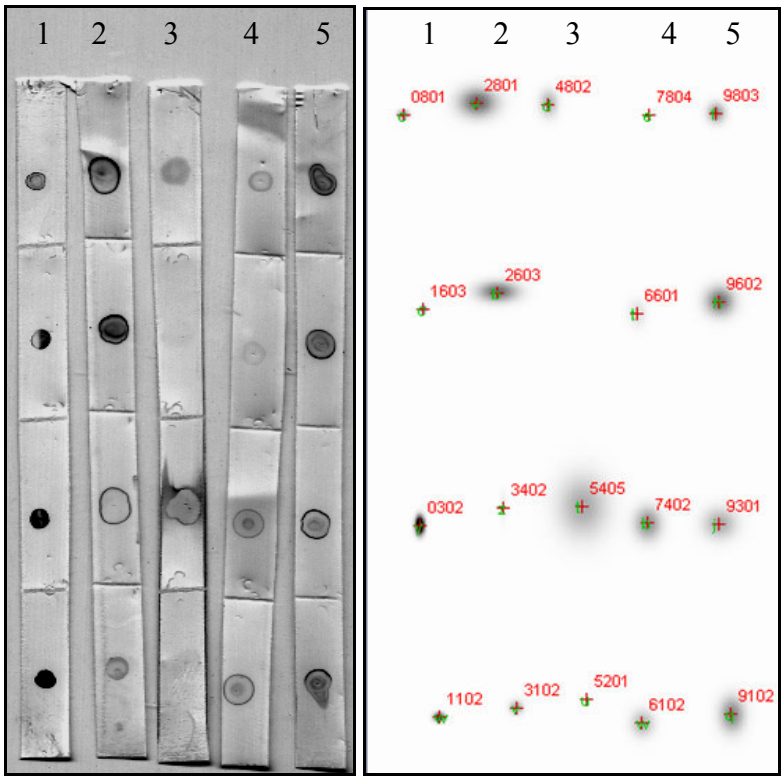


Figura 5. Foto representativa dos "dots" gerados a partir do teste dot-blotting e seu respectivo modo de leitura. A coluna 1 (esquerda) apresenta o antígeno sintético eCATH 3 nas concentrações de 10; 50; 100 e 200ng. As colunas restantes são os "dots" gerados a partir de amostras de plasma seminal de 15 garanhões selecionados.

Tabela 4. Concentração (ng/mL) das catelicidinas equinas no plasma seminal de garanhões obtida pelo teste de Dot-blotting.

Animal	Catelicidinas		
	eCATH1	eCATH2	eCATH3
1	25,96	69,43	283,43
2	245,58	106,27	248,47
3	9,70	<10*	<10*
4	22,14	98,58	55,24
5	>200*	124,42	141,18
6	>200*	107,89	324,08
7	9,14	11,62	<10*
8	>200*	53,48	<10*
9	339,60	100,55	60,12
10	51,01	67,15	236,27
11	11,11	69,14	159,07
12	>200*	141,32	144,46
13	>200*	20,12	252,41
14	109,74	<10*	219,31
15	>200*	48,03	240,01

*Amostras com resultados com quantidade < 10ng ou > de 200ng.

5.3. Ultrassonografia uterina

Na avaliação do conteúdo uterino por ultrassonografia não foi verificada presença de líquido no lúmen uterino de nenhuma égua no momento 1 de avaliação em todos tratamentos aplicados. Além disso, foi constatado que no momento 2 não ocorreu diferença estatística ($p>0,05$) entre as éguas resistentes e susceptíveis. Porém, no momento 3 as éguas resistentes apresentaram, quando comparadas as susceptíveis ($p<0,003$), menor quantidade de líquido acumulado na região da bifurcação dos cornos uterinos. Adicionalmente, ao se efetuar as análises dentro de cada momento e grupo de éguas não foi verificada diferença estatística ($p>0,05$) (Figura 6).

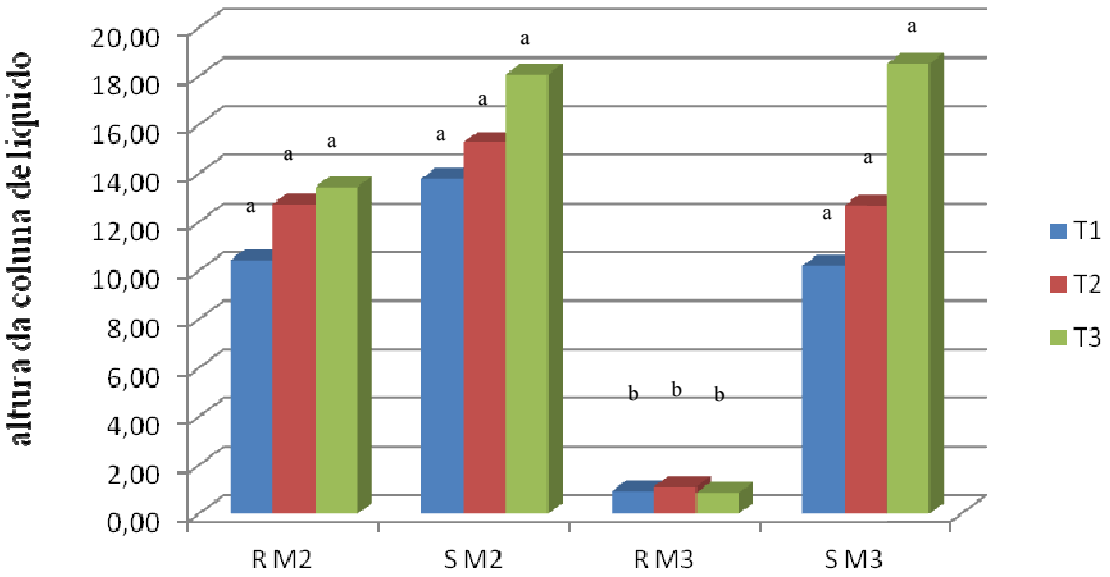


Figura 6. Média dos valores da coluna de fluído visualizado na área da bifurcação uterina (mm) nos momentos M2 e M3 em éguas resistentes e susceptíveis a EPPC. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M2, 24 horas após a infusão de plasma seminal ou a inseminação artificial; M3, 48 horas após a infusão de plasma seminal ou inseminação artificial; S, éguas susceptíveis ; R, éguas resistentes.
[a,b] Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p<0.05$).

Por outro lado, no ciclo controle (T1) das éguas susceptíveis foi verificado que com o passar do tempo a redução do líquido acumulado no lúmen uterino foi maior quando comparado ao ciclo em que foi realizado a infusão uterina de plasma seminal ($p<0,05$) e ao ciclo da inseminação artificial ($p<0,002$) no qual foi verificado um leve aumento. Entretanto, para as éguas resistentes foi verificado que a capacidade de remoção do líquido acumulado no momento 2 foi estatisticamente a mesma ($p>0,05$) independentemente se foi realizada a infusão de plasma seminal ou a inseminação artificial ou ainda se o útero não sofreu nenhum desafio (controle). Os dados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores médios (mm) e porcentagem de redução (%) da altura da coluna de líquido acumulado na região da bifurcação uterina de éguas resistentes e susceptíveis a EPPC do momento M2 para o M3.

	Resistentes		**Redução**	**Susceptíveis**		**Redução**
	M2	**M3**	**%**	**M2**	**M3**	**%**
T1	$10,5\pm1,9^{a}$	$0,9\pm0,4^{b}$	$91,1^{A}$	$14,4\pm10,7^{a}$	$10,2\pm6,0^{a}$	$26,0^{B}$
T2	$12,7\pm7,3^{a}$	$1,1\pm0,5^{b}$	$91,2^{A}$	$15,3\pm5,0^{a}$	$12,7\pm6,5^{a}$	$17,0^{C}$
T3	$13,5\pm3,5^{a}$	$0,9\pm0,4^{b}$	$93,5^{A}$	$18,1\pm5,0^{a}$	$18,5\pm6,9^{a}$	$-2,5^{D}$

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). ^{A,B,C,D} Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M2, 24 horas após a infusão de plasma seminal ou a inseminação artificial; M3, 48 horas após a infusão de plasma seminal ou inseminação artificial.

5.4. Citologia exfoliativa uterina

A porcentagem de neutrófilos em relação às células endometriais nas amostras de citologia exfoliativa uterina indica uma diferença estatística entre as éguas resistentes e susceptíveis a EPPC ($p<0,05$) no que diz respeito a resposta neutrofílica dentro do período estudado. Além disso, as interações do útero com plasma seminal e do útero com os espermatozoides seguem o mesmo padrão para as éguas resistentes e susceptíveis.

Vinte e quatro horas após a indução da ovulação (M1) as éguas resistentes não apresentaram diferença entre si ($p=0,1246$). No momento 2, o plasma seminal (T2) não induziu uma migração neutrofílica maior do que aquela observada num ciclo estral sem cobertura (controle) ($p=0,1190$). Porém, quando foi realizada a inseminação artificial (T3) observou-se uma maior migração neutrofílica no útero ($p<0,01$) ao ser comparado com os tratamentos 1 e 2. Adicionalmente, no momento 3 não foi observada diferença entre os tratamentos ($p>0,05$) (Figura 7A).

Para as éguas susceptíveis, no momento M1 não ocorreu diferença entre os tratamentos propostos ($p=0,3498$). No momento 2 a infusão de plasma seminal não foi suficiente para induzir a migração neutrofílica, pois não há diferença quando comparada ao ciclo controle ($p=0,1246$), entretanto a presença dos espermatozoides induz realmente uma migração de neutrófilos superior aquela vista no ciclo controle ($p<0,01$) ou no ciclo onde foi realizada a infusão uterina de plasma seminal ($p<0,01$). Além disso, os resultados visualizados no momento 3 não mostraram diferença entre os tratamentos 1 e 2 ($p=0,0872$), mas os espermatozoides induziram maior migração de neutrófilos no útero (T1 *vs* T3 e T2 *vs* T3, $p<0,01$) (Figura 7B).

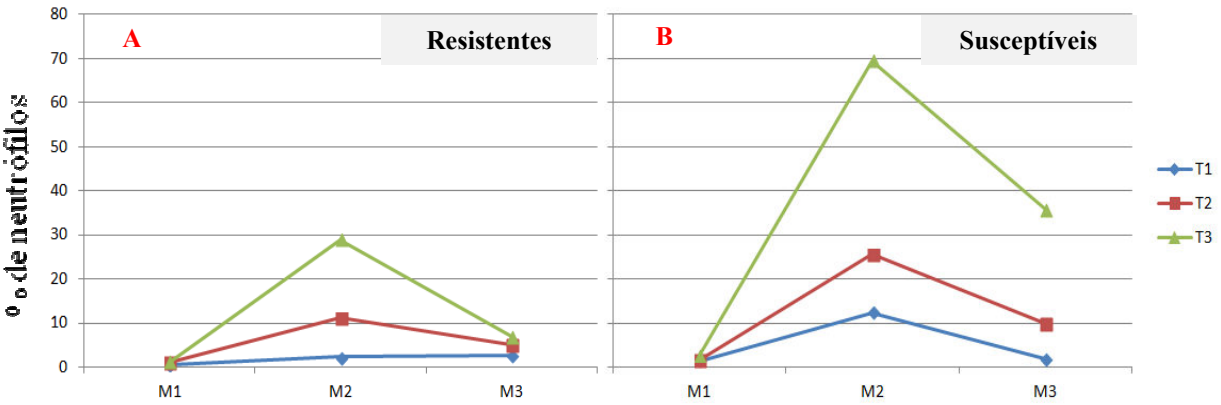


Figura 7. Porcentagem de neutrófilos observados em exame citológico ao longo do tempo analisado para as éguas resistentes (A) e susceptíveis (B) a EPPC. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, 24 horas após a indução da ovulação, M2, 24 horas após a infusão de plasma seminal ou a inseminação artificial; M3, 48 horas após a infusão de plasma seminal ou inseminação artificial.

A fertilidade foi aferida pela taxa de recuperação embrionária no oitavo dia após a ovulação, somente foram utilizados para o experimento os ciclos estrais com uma inseminação artificial com um total de $1x10^9$ de espermatozóides totais em torno de 89±4 % de motilidade total. A taxa de recuperação embrionária para as éguas resistentes foi de 70% (n=10) e para as suceptíveis foi de 40% (n=10), dados utilizados para comprovar a eficiência reprodutiva do único garanhão utilizado no experimento.

5.5. qPCR

Os genes endógenos β-actina (R^2 = 0,997, eficiência = 0,92) e G3PDH (R^2 = 0,997, eficiência = 0,94) foram excluídos por se apresentarem menos estáveis do que o GaPDH na reação de amplificação. As amostras analisadas geraram curvas de

amplificação e dissociação para o gene endógeno GaPDH (R^2 = 0,997, eficiência = 0,94) nas éguas resistentes e susceptíveis. Para todos os alvos analisados, interleucina 1β (R^2 = 0,999, eficiência = 0,93), interleucina 6 (R^2 = 0,999, eficiência = 0,94), interleucina 8 (R^2 = 0,998, eficiência = 0,91), interleucina 10 (R^2 = 0,998, eficiência = 0,92) e fator de necrose tumoral alfa (R^2 = 0,999, eficiência = 1,08) foram geradas curvas de amplificação e de dissociação seguindo a metodologia anteriormente citada.

Tanto as éguas resistentes como as susceptíveis à EPPC passaram pelos mesmos tratamentos onde a primeira colheita (M1) foi realizada ainda durante o estro e as duas coletas consecutivas (M2 e M3) foram realizadas após a ovulação. Além do ciclo controle (T1) foram realizadas a infusão uterina de plasma seminal (T2) e a inseminação artificial (T3).

Na quantificação relativa da IL-1β nas éguas susceptíveis foi verificado que a mudança de estro (M1) para diestro (M2) não alterou a expressão do RNAm. Porém, após a infusão uterina de plasma seminal foi possível verificar um aumento na sua expressão em M2 (p=0,0195) e M3 (p=0,0059) quando comparado ao M1. Adicionalmente, os mesmos resultados foram visualizados quando da inseminação artificial, ou seja, a IL-1β teve sua expressão aumentada ao longo do tempo quando comparado ao M1 para o momento M2 (p=0,023) e para o M3 (p=0,0412). Para as éguas resistentes, a expressão de IL-1β diminuiu quando foi realizada a inseminação artificial (M2, p=0,0087 e M3, p=0,0092) comparada ao momento 1 (Tabela 6).

Na comparação entre os tratamentos foi constatada uma diferença estatística na expressão dessa interleucina para as éguas susceptíveis apenas no momento M2, onde a infusão de plasma seminal induziu um aumento (p=0,0492) e a inseminação artificial um aumento ainda maior (p=0,024), contrariamente as éguas resistentes não tiveram a expressão alterada devido aos tratamentos empregados (p>0,05). As éguas susceptíveis

não apresentam diferença estatística na expressão do RNAm da IL-1β no ciclo controle. Verificou-se que as éguas susceptíveis apresentam a expressão dessa interleucina aumentada em comparação as resistentes no M2 (p=0,0091) e M3 (p=0,0102) tanto para o desafio com plasma seminal quanto para o com sêmen (M2, p=0,0101 e M3, p=0,0178).

Tabela 6. Medianas e variância da expressão relativa do RNAm da IL-1β nas células endometriais de éguas susceptíveis e resistentes e os efeitos do plasma seminal e da inseminação artificial.

	Susceptíveis			**Resistentes**		
	M1	**M2**	**M3**	**M1**	**M2**	**M3**
T1	$32,5^{aA}$ (17,4-4321)	$59,9^{aA}$ (29,7-909)	$96,9^{aA}$ (37,4-3294)	$10,7^{bA}$ (4,5-247)	$50,6^{bA}$ (1,7-86,7)	$60,3^{bA}$ (1,9-48749)
T2	40^{aA} (13,2-145)	109^{cB} (18,1-37879)	141^{cA} (15-7193)	$11,6^{bA}$ (1,3-1462)	$53,4^{bA}$ (9,7-2681)	$38,7^{bA}$ (8,3-167)
T3	$56,8^{aA}$ (24,8-449)	196^{cC} (24,3-4544)	$157,3^{cA}$ (16,6-1943)	$13,1^{bA}$ (4,9-512)	$38,7^{bA}$ (3,1-1075)	$24,6^{bA}$ (6,14-24435)

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05). ^{A,B,C} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05). T1: ciclo controle; T2: infusão uterina de plasma seminal; T3: inseminação artificial.

Não foi verificada diferença estatística (p>0,05) na expressão do RNAm da IL-6 independente do contato do útero com o plasma seminal ou com sêmen fresco diluído tanto nas éguas susceptíveis como nas resistentes, com exceção de um aumento no momento M2 para o tratamento com inseminação artificial nas éguas susceptíveis

(p=0,0024). Entretanto, ao se comparar as éguas susceptíveis com as resistentes as primeiras sempre apresentam maior expressão independente do momento avaliado tanto para o ciclo controle (T1) (M1, p=0,0371; M2, p=0,0137; M3, p=0,0148) como para o ciclo com infusão de plasma seminal (T2) (M1, p=0,0136; M2, p=0,0059; M3, p=0,0195) e para o ciclo com inseminação artificial (T3) (M1, p=0,0279; M2, p=0,002; M3, p=0,0098). Esses dados estão expostos na Figura 8.

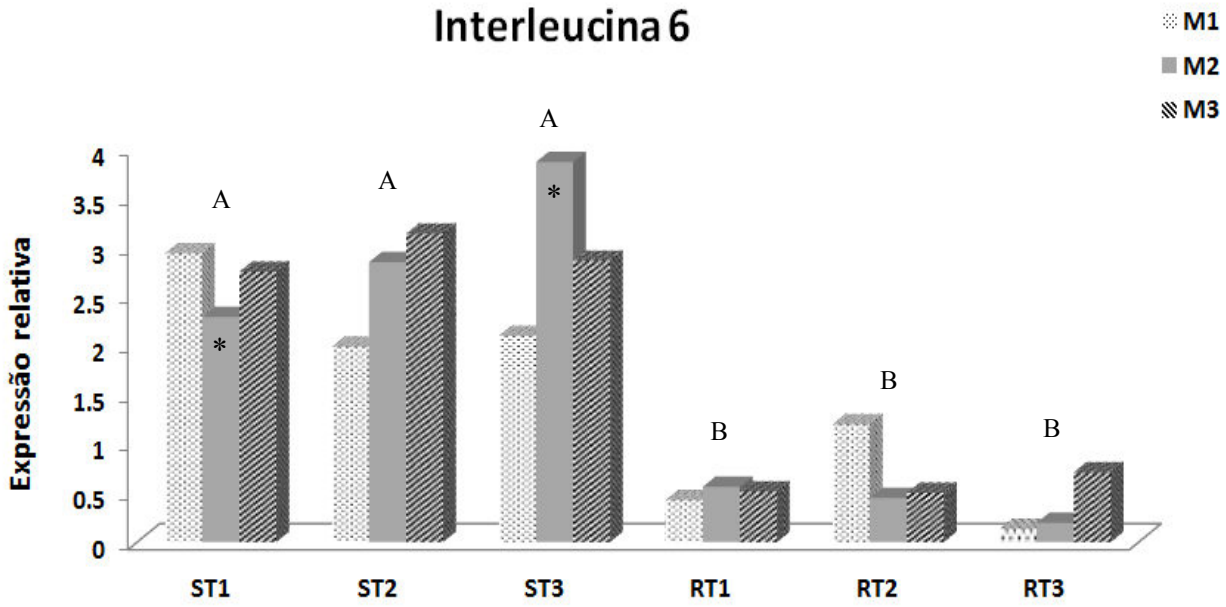


Figura 8. Quantificação da expressão relativa da IL-6 em relação ao GaPDH. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, momento 1; M2, momento 2; M3, momento 3. * Diferença estatística para o grupo de égua e tratamento utilizado. A e B, letras diferentes no mesmo tratamento indicam diferença estatística entre as éguas resistentes e susceptíveis.

No ciclo controle (T1) não foi observada diferença significativa entre as éguas resistentes e susceptíveis ao longo dos 3 momentos de coleta, mas ao se comparar os dois grupos de éguas foi possível visualizar que as éguas susceptíveis sempre tem maior expressão do RNAm da IL-8 nos momentos M1 (p=0,003), M2 (p=0,0101) e M3 (p=0,0057) do que as resistentes.

A infusão uterina de plasma seminal (T2) não provocou alteração na expressão dessa interleucina para as éguas resistentes, o contrário ocorre com as susceptíveis, onde a presença desse agente induz um aumento 24 horas (M2) após a infusão (p=0,0056) seguida por uma diminuição após 48 horas (M3) (p=0,026), porém ainda se mantendo superior aquela vista no primeiro momento (p=0,0156). Além disso, comparativamente as éguas susceptíveis apresentam maior expressão de RNAm da IL-8 quando comparadas as resistentes em todos os momentos avaliados, M1 (p=0,039), M2 (p=0,0084) e M3 (p=0,0137).

Após a inseminação artificial (T3) as éguas susceptíveis tiveram uma aumento na expressão do RNAm da IL-8 no momento M2 (p=0,0192) quando comparado ao M1, porém no momento M3 essa expressão estava menor (p=0,0133) do que aquela vista em M2, mas ainda maior do que em M1 (p=0,0249). Ainda para a interleucina 8, as éguas resistentes tiveram um aumento na expressão no momento 2 (p=0,0133), o qual se manteve praticamente constante até o momento M3. A expressão para essa interleucina também foi maior para as éguas susceptíveis quando comparados cada momento individualmente (M1, p=0,0057; M2, p=0,002; M3, p=0,0076).

Ao se comparar a diferença entre os tratamentos individualmente para cada momento de coleta não foi verificada a influência do plasma seminal ou da inseminação artificial na expressão do RNAm da IL-8 (p>0,05) exceto nas éguas resistentes momento M2 quando foi feita a inseminação artificial (p=0,0279) (Tabela 7).

Tabela 7. Medianas e variâncias da expressão relativa do RNAm da IL-8 nas células endometriais de éguas susceptíveis e resistentes e os efeitos do plasma seminal e da inseminação artificial.

	Susceptíveis			Resistentes		
	M1	**M2**	**M3**	**M1**	**M2**	**M3**
T1	$67,2^{abA}$ (7,9-668)	129^{aA} (78,5-1169)	284^{aA} (102-2685)	$52,5^{bA}$ (1,6-178)	$44,9^{bA}$ (7,5-366)	$67,8^{bA}$ (13,2-1208)
T2	117^{aA} (9,2-283)	229^{bA} (40,3-63659)	153^{cA} (28,8-14076)	$68,7^{dA}$ (41-667)	$70,7^{dA}$ (27,1-204)	$90,3^{dA}$ (25,6-223)
T3	90^{aA} (38,2-581)	257^{bA} (89,9-15533)	152^{cA} (11-2176)	$50,8^{dA}$ (1,2-320)	136^{eB} (1,7-209)	126^{eA} (31,1-4008)

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p<0,05$). ^{A,B} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p<0,05$). T1: ciclo controle; T2: infusão uterina de plasma seminal; T3: inseminação artificial.

Na quantificação relativa da expressão do RNAm da IL-10 (Figura 9) não foi verificada diferença estatística para o tratamento 1 (Controle) em nenhum momento avaliado independente se as éguas eram susceptíveis ou resistentes. No tratamento 2, infusão de plasma seminal, as éguas susceptíveis não demonstram diferença na expressão de IL-10 entre os momentos avaliados, fato esse que também ocorre para as resistentes, ainda foi verificado que o plasma seminal não induziu uma expressão diferenciada entre as éguas resistentes e susceptíveis. No tratamento 3, inseminação artificial, as éguas susceptíveis não apresentam diferença estatística entre os diversos momentos, entretanto as resistentes mostram um aumento na expressão de IL-10 somente no momento M3 ($p=0,019$) comparado ao M1. Ao se comparar as éguas resistentes com as susceptíveis após a inseminação artificial foi verificada no momento M2 uma menor expressão nas resistentes ($p=0,021$).

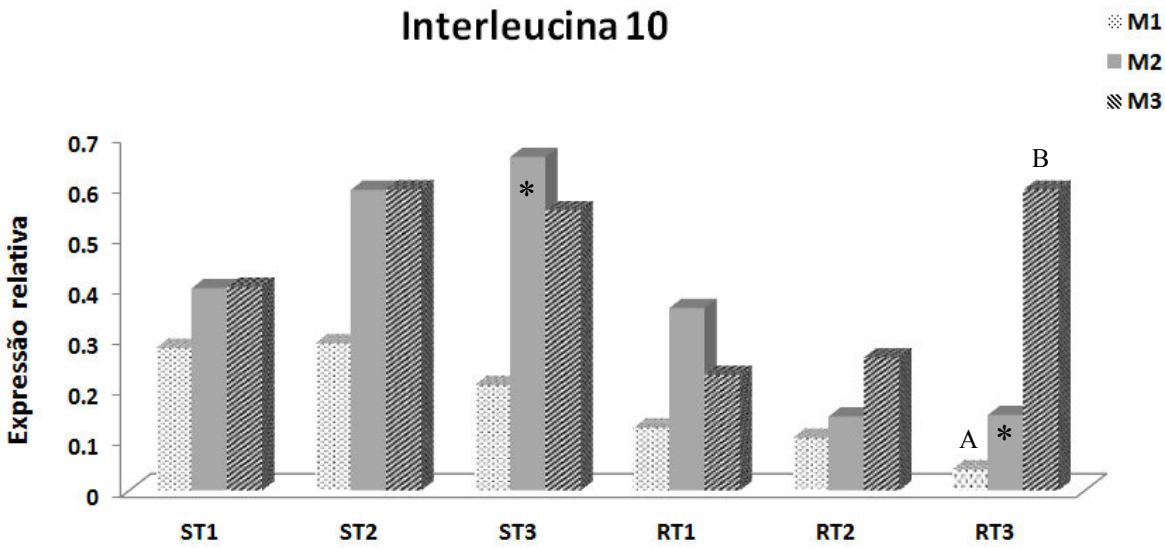


Figura 9. Quantificação da expressão relativa da IL-10 em relação ao GaPDH. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, momento 1; M2, momento 2; M3, momento 3. * Diferença estatística para o mesmo tratamento em um momento específico. A e B, letras diferentes indicam diferença estatística entre os momentos para um tratamento específico.

As éguas resistentes não apresentaram diferença estatística na expressão relativa de TNF-α entre os tratamentos propostos, momentos avaliados e grupos de éguas. As éguas susceptíveis não apresentaram diferença na expressão dessa interleucina no ciclo controle (T1) ou quando foi feita a infusão uterina de plasma seminal (T2). Entretanto, ainda para as éguas susceptíveis, apenas no momento M3, foi verificado um aumento significativo na expressão de TNF-α ao se comparar o ciclo controle com o de infusao de plasma seminal (p=0,0408) e uma diminuição na comparação do ciclo controle com o de inseminação artificial (p=0,0488) e do ciclo de infusão de plasma seminal com o de inseminação artificial (p=0,015) (Figura 10).

Os resultados gerais da expressão relativa do RNAm das interleucinas estudadas em relação aos níveis basais estão expostas na Tabela 8.

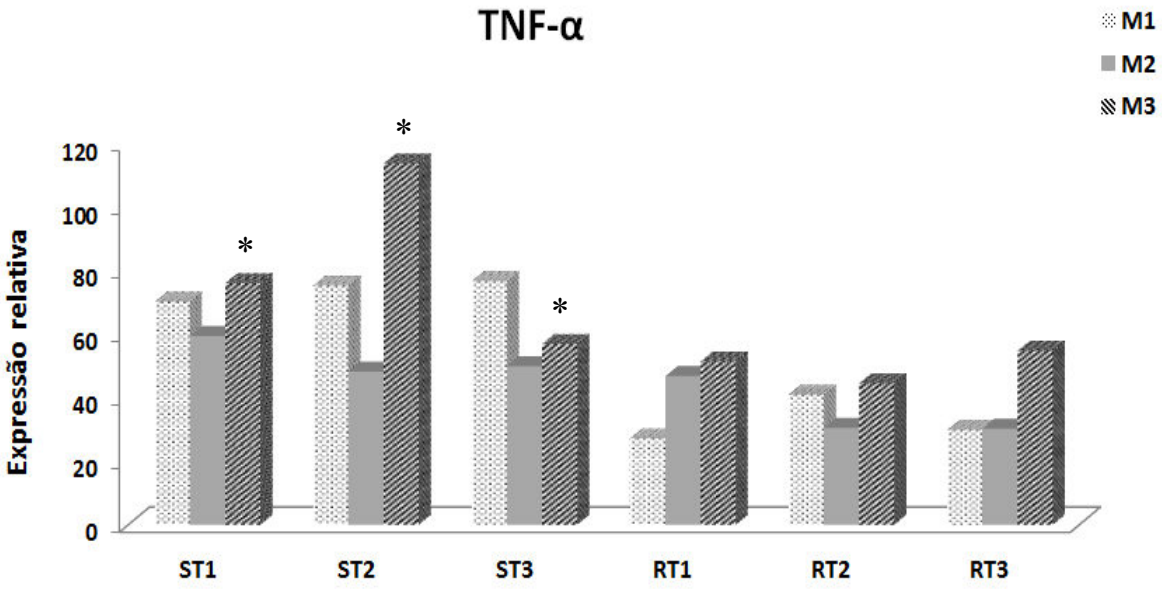


Figura 10. Quantificação da expressão relativa do TNF-α em relação ao GaPDH. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, momento 1; M2, momento 2; M3, momento 3. * Diferença estatística entre tratamentos em um momento específico.

Tabela 8. Comparação da expressão relativa do RNAm das interleucinas 1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α as 24 (M2) e 48 (M3) horas após o desafio uterino.

	Momento 2					Momento 3				
	IL-1β	**IL-6**	**IL-8**	**IL-10**	**TNF-α**	**IL-1β**	**IL-6**	**IL-8**	**IL-10**	**TNF-α**
ST1 *vs* ST2	↓*	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓*
ST1 *vs* ST3	↓*	↓*	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑*
ST2 *vs* ST3	↓*	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑*
RT1 *vs* RT2	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑
RT1 *vs* RT3	↑	↑	↓*	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓
RT2 *vs* RT3	↑	↑	↓*	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓

* Indica diferença significativa ($p<0,05$) entre as comparações. S: Susceptíveis e R: resistentes.

Para conferir se a expressão do RNAm das citocinas avaliadas variam mutuamente uma análise de correlação foi feita entre todas elas de forma pareada em cada momento e tratamento. Assim sendo, no tratamento 1 para o momento M1 foi verificado uma alta correlação entre o aumento da expressão IL-6 e IL-8 ($r=0,82$; $p=0,002$) nas éguas susceptíveis e IL-8 e TNF-α ($r=0,88$; $p=0,001$) e IL-10 e TNF-α ($r=0,88$; $p=0,001$) nas éguas resistentes. Ainda no tratamento 1, mas dessa vez no momento M3, para as éguas susceptíveis foi constatada uma forte correlação entre IL-6 e IL-8 ($r=0,9$; $p<0,0001$).

Quando foi aplicado o tratamento 2 somente as éguas susceptíveis mostraram correlações fortes no momento M2 entre as IL-6 e IL-8 ($r=0,94$; $p<0,0001$) e IL-6 e IL-10 ($r=0,72$; $p=0,009$) e IL-8 e IL-10 ($r=0,73$; $p=0,008$) e no momento M3 entre as IL-6 e IL-8 ($r=0,85$; $p=0,001$) e IL-8 e IL-10 ($r=0,77$; $p=0,005$).

As éguas susceptíveis que passaram por inseminação artificial apresentaram uma forte correlação entre IL-6 e IL-8 ($r=0,83$; $p=0,001$) apenas no momento M1. Já as éguas resistentes mostraram correlações fortes nos 3 momentos avaliados sendo que no momento M1 a correlação entre IL-6 e IL-8 ($r=0,82$; $p=0,004$) e IL-6 e IL-10 ($r=0,85$; $p=0,002$), para o momento M2 se verificou correlações entre IL-6 e IL-8 ($r=0,72$; $p=0,009$) e IL-6 e IL-10 ($r=0,80$; $p=0,002$) e IL-8 e IL-10 ($r=0,83$; $p=0,001$) e ainda para o momento M3 a correlação entre IL-8 e IL-10 ($r=0,76$; $p=0,006$).

6. DISCUSSÃO

6.1. Catelicidinas equinas no plasma seminal de garanhões

Os AMPs podem influenciar processos intracelulares por interações com receptores ou sinalizadores moleculares e mediar os efeitos quimiotáxicos e pró-inflamatórios (BRUHN et al., 2011). As catelicidinas atacam as células estranhas ao indivíduo apresentando uma função antibacteriana (BROGDEN, 2005), fungicida (KAVANAGH & DOWD, 2004; KOO et al., 2004) e antiviral (JENSSEN et al., 2006) e ainda apresentam uma função quimiotáxica para as células do sistema imune inato além de ser responsável pela primeira liberação de fatores de quimiotaxia, expressão das interleucinas pró inflamatórias (IL-6 e IL-8) e de receptores nas células do sistema de defesa inata do organismo hospedeiro (CHAPWANYA et al., 2009).

Vários fatores quimiotáxicos e AMPs têm sido detectados durante a inflamação em muitos tecidos e órgãos. Dessa forma, esses peptídeos apresentam função reguladora durante a inflamação no controle da expressão das interleucinas pró inflamatórias e podem ainda atuar de maneira direta e específica como um fator quimiotático na atração das células do sistema imune (NIYONSABA et al., 2002).

Skerlavaj et al. (2001) identificaram a presença de eCATH-3 em secreções inflamatórias indicando que esse peptídeo pode também ser liberado em fluído extracelular evidenciando sua atividade sinérgica com outras moléculas de defesa do organismo hospedeiro. Foi verificada a presença de catelicidinas em diversas partes do sistema reprodutivo humano, no epidídimo, associadas aos espermatozóides e no plasma seminal, sugerindo que elas são importantes para a proteção espermática por

contribuírem para um ambiente estéril durante a fertilização (MALM et al., 2000; ANDERSON et al., 2002) e prevenirem a infecção após o ato sexual (SORENSEN et al., 2003) além de inibir a produção de biofilme do *S. aureus* e demonstrar baixa citotoxicidade contra células hospedeiras apesar de não influir na sua ligação com a bactéria, podendo ainda atuar como agente antimicrobiano e no tratamento de infecções crônicas (DEAN et al., 2011).

A concentração total da catelicidina no plasma seminal de humanos varia de 40 a 140 μg/mL (MALM et al., 2000; ANDERSON et al., 2002) e Malm et al. (2000) constataram que esse peptídeo está presente no plasma seminal em uma concentração 70 vezes maior do que aquela vista no plasma e essa alta concentração está relacionada com a atividade anti bacteriana observada. Uma quantidade significativa desse peptídeo está associado aos espermatozóides humanos, enquanto os neutrófilos contém 0,627 $\mu g/10^6$ células (SORENSEN et al., 1997) a célula espermática carrega consigo 0,196 $\mu g/10^6$ espermatozóides que oferecem proteção contra micro organismos durante a fertilização (MALM et al., 2000).

Ao contrário do visto em humanos, no plasma seminal de garanhões as concentrações das 3 catelicidinas variam em um intervalo maior, porém numa quantidade menor. Entretanto, outra diferença verificada em equinos é que eles possuem 3 tipos diferentes do peptídeo não estando claro as interações entre eles e nem suas funções individuais, talvez uma ação em conjunto seja equivalente aquela vista em humanos, onde a catelicidina é responsável por aumentar a expressão de IL-8 e proteger o útero de infecções.

Observações sugerem que enquanto o sêmen de determinados garanhões provoca uma reação inflamatória exacerbada, o de outros é responsável por uma resposta inflamatória mais branda independente da égua ser ou não susceptível à EPPC

(TROEDSSON et al., 2000, TROEDSSON et al., 2002). Foi constatado em mulheres que apresentaram reação alérgica aos espermatozóides do marido, gerando casos de infertilidade semelhante ao que ocorre nas éguas susceptíveis, que o plasma seminal desses homens continha concentração 40 vezes maior da catelicidina (MALM et al., 2000). Traçando um paralelo de equivalência com os humanos, apesar dos equinos possuírem 3 tipos de catelicidinas com diferentes quantidades delas no plasma seminal, esse peptídeo pode estar diretamente envolvido na indução de uma inflamação mais intensa e longa no útero das éguas induzindo casos de sub fertilidade.

6.2. Expressão uterina de interleucinas

Assim como Fumuso et al. (2003) constatou-se que a expressão do RNAm da IL-1β durante o estro foi maior para as éguas suceptíveis do que para as resistentes, contrariamente ao que foi constatado por Woodward et al. (2013). Essa situação se repete durante o diestro em nesse estudo e no de Fumuso et. (2003), porém constatou-se resultados que mostram que tanto para as éguas resistentes como para as susceptíveis a expressão de IL-1β aumenta no diestro contrariamente ao observado por outros autores, fato que pode estar relacionado ao período distinto de colheita, posto que as colheitas foram realizadas no início do diestro.

Resultados diferentes foram observados dependendo do tipo de desafio uterino, Palm et al. (2008) não verificaram diferença na expressão da IL-1β 12 horas após a infusão uterina de plasma seminal ou diluentes de sêmen, concordando com Christoffersen et al. (2010) que constatou diferença apenas as 3 horas após infusão de *E. coli*. Quando o desafio foi feito com espermatzóides mortos, Woodward et al. (2013) verificou diferença 2 e 6 horas e Fumuso et al. (2003) não constatou diferença 24 horas

após a inseminação tanto para as éguas resistentes como para as susceptíveis. Porém, 24 e 48 horas após a infusão de plasma seminal as éguas susceptíveis apresentaram aumento na expressão da IL-1β, a mesma situação se repetiu quando o desafio foi feito com sêmen fresco diluído. Entretanto a expressão torna-se ainda maior, embora os resultados de Fumuso et al. (2003) indicarem que éguas susceptíveis têm maior expressão do que as resistentes quando as amostras são tomadas em fase mais tardia do diestro. Ao que parece, a expressão da IL-1β é diferente quando é usado espermatozóides viáveis na inseminação artificial porque, apesar dos resultados muitas vezes conflitantes principalmente pelas diferenças na metodologia, baseado em nossos resultados éguas susceptíveis mantêm a expressão dessa interleucina ativada por mais tempo.

Concordando com Woodward et al. (2013) não foi constatada diferença na expressão do RNAm da IL-6 previamente ao desafio uterino tanto para as éguas resistentes como para as susceptíveis, contrariando achados prévios uma vez que essa expressão foi maior para as éguas suceptíveis (FUMUSO et al., 2003). Verificou-se que a expressão de IL-6 se manteve estatisticamente inalterada nos períodos avaliados após a ovulação para os dois grupos de éguas e no diestro as éguas susceptíveis apresentaram maior expressão do que as resistentes, fato também constatado por Fumuso et al. (2003) com a ressalva que nesse estudo as susceptíveis tiveram menor expressão dessa interleucina no diestro.

Em outra situação, o desafio uterino com plasma seminal ou sêmen fresco diluído não foi capaz de induzir alterações na expressão da IL-6 em ambos os grupos de éguas com exceção feita a um aumento em sua expressão para as éguas susceptíveis 24 horas após a inseminação artificial. Além disso, as éguas susceptíveis expressam mais RNAm para IL-6 do que as resistentes sob quaisquer circunstâncias. Outros trabalhos

apresentam resultados divergentes, Palm et al. (2008) não verificaram diferença 12 horas após a infusão de plasma seminal, ainda não se verifica diferença após 24 horas da inseminação com espermatozóides mortos entre resistentes e susceptíveis e a presença dos espermatozóides induziu um aumento na expressão dessa interleucina nos 2 grupos de éguas (FUMUSO et al., 2003); Woodward et al. (2013) verificaram que a expressão de RNAm para IL-6 estava aumentada as 2 e 6 horas após inseminação com espermatozóides mortos em éguas resistentes e susceptíveis e que ainda tinha uma diferença significativa entre os dois grupos, com as éguas resistentes expressando mais RNAm do que as susceptíveis às 6 horas, mas 24 horas após a inseminação esse estudo encontrou maior expressão do que aquela prévia ao desafio, em desacordo como os resultados anteriormente apresentados, sendo consenso que após 24 horas do desafio não há diferença entre éguas susceptíveis e resistentes.

Enquanto a IL6 é considerada uma citocina pró-inflamatória, ela também tem funções de proteção no início inflamação aguda por meio da modulação de outras citocinas também pró inflamatórias (BARTON & JACKSON, 1993; XING et al, 1998; DIAO & KOHANAWA, 2005). Dessa forma, na resolução da inflamação aguda a IL-6 está envolvida na transição da imunidade inata para a adquirida atuando sobre a persistência da inflamação crônica (JONES, 2005). É possível que o aumento da expressão do RNAm da IL-6 verificada as 24 horas após a inseminação em éguas susceptíveis reflita uma resposta pró-inflamatória retardada, não assumindo seu papel modulatório.

Na quantificação relativa da expressão do RNAm da IL-10 não foi verificada diferença estatística para as éguas susceptíveis ou resistentes no estro ou no diestro, resultado em parte semelhante ao visto por Woodward et al. (2013) anteriormente ao desafio uterino e contrário ao que foi relatado por Fumuso et al. (2007) que verificaram

que além das éguas susceptíveis apresentarem menor expressão dessa interleucina do que as resistentes no estro elas também apresentaram maior expressão no diestro em comparação ao estro.

Após a infusão de plasma seminal as éguas susceptíveis não demonstraram diferença na expressão de IL-10 entre os momentos avaliados, o que também ocorreu para as resistentes. Foi verificado que o plasma seminal não induziu uma expressão diferenciada entre as éguas resistentes e susceptíveis. Por outro lado, a inseminação artificial não foi capaz de alterar a expressão da IL-10 nas éguas susceptíveis e nas resistentes, mas 24 horas após a inseminação as éguas susceptíveis tinham uma expressão maior dessa interleucina. Diferentemente do que foi verificado nesse estudo, 24 horas após a inseminação artificial com espermatozoides mortos as éguas susceptíveis tiveram menor expressão de IL-10 do que as resistentes (FUMUSO et al., 2007), resultado não condizente com os encontrados por Woodward et al. (2013) que não encontraram diferença nesse mesmo tempo, mas somente 3 horas após a inseminação, mesmos achados mencionados por Christoffersen et al. (2010) após a infusão de *E. coli*.

O equilíbrio na resposta inflamatória é feito pelas citocinas pró-inflamatórias que atuam iniciando e aumentando essa resposta enquanto as anti-inflamatórias as modulando, por isso que a IL-10 é essencial na modulação da resposta imune e sua deficiência pode levar a danos ao tecido (CYKTOR & TURNER, 2011). Neste estudo, as éguas susceptíveis tiveram uma modulação da resposta imune menos definida do que as éguas resistentes, sugerindo que estas éguas foram menos capazes de modular a inflamação.

As éguas resistentes e as susceptíveis não apresentaram diferença estatística na expressão relativa de TNF-α, somente em 48 horas após a infusão de plasma seminal

que foi constatada maior expressão dessa interleucina para as éguas susceptíveis. Diversos outros trabalhos apresentaram resultados semelhantes, para as éguas resistentes Palm et al. (2008) não verificaram diferenças na expressão 12 horas após a infusão de plasma seminal, já Woodward et al. (2013) constataram uma expressão aumentada 2 e 6 horas e mais baixa do que a inicial as 24 horas após a inseminação e nas éguas susceptíveis não houve diferença. Fumuso et al. (2003) não verificaram diferenças entre éguas susceptíveis e resistentes 24 horas após a inseminação, mas no diestro as éguas susceptíveis tinham maior expressão dessa interleucina e Christoffersen et al. (2010) somente encontraram maior expressão de TNF-α 3 horas após a inoculação de *E. coli*, sendo que nos outros momentos a expressão era semelhante.

Ainda, diferente dos resultados desse estudo, Fumuso et al. (2003) constataram que sem desafio uterino as éguas susceptíveis apresentam maior expressão do que as resistentes no estro e no diestro e que as éguas resistentes não apresentaram diferença entre estro e diestro e que as susceptíveis tinham menor expressão durante o diestro. Aparentemente o TNF-α exerce sua função em duas fases distantes da inflamação uterina, uma mais precoce, provavelmente induzindo a liberação de IL-1β e a produção das proteínas de fase aguda e de IL-6, e numa fase mais tardia modificando a resposta imune com a parada da produção dessas interleucinas pró-inflamatórias.

Nossos resultados indicam que os 2 grupos de éguas não apresentaram diferença entre estro e diestro quando não há desafio ao útero, mas as éguas resistentes apresentam menor expressão de IL-8 concordando com Woodward et al. (2013) e parcialmente com Fumuso et al. (2007) que no estro verificaram a mesma situação, mas no diestro constataram um aumento da expressão do RNAm da IL-8 para todas as éguas.

A infusão de plasma seminal não altera a expressão da IL-8 para as éguas resistentes, mas nas susceptíveis ocorre uma aumento as 24 com diminuição as 48 horas, mas ainda mantendo níveis mais altos do que os iniciais. Na presença de espermatozoides o útero responde da mesma forma, aumentando a expressão as 24 e diminuindo as 48 horas, mas se mantendo acima dos níveis iniciais para as éguas susceptíveis. Porém as éguas resistentes mantêm a expressão aumentada as 24 e 48 horas após a agressão, mesmo sendo inferior à observada nas susceptíveis.

Fumuso et al. (2007) constataram que na presença de espermatozoides mortos ocorre maior expressão de IL-8 nas éguas susceptíveis no estro e no diestro e Woodward et al. (2013) que a expressão do RNAm da IL-8 em éguas resistentes e susceptíveis estava aumentada logo após a inseminação retornando aos níveis basais em 24 horas e que ainda não houve diferenças na expressão entre as éguas susceptíveis e resistentes, divergindo de Christoffersen et al. (2010) que verificaram aumento na expressão dessa interleucina apenas 3 horas da inoculação bacteriana e Nash et al. (2010b) que não verificaram diferença na expressão de IL-8 24 horas após a inseminação com sêmen congelado.

Os resultados observados na citologia uterina para os PMNs no presente estudo apontam que após a cobertura as éguas susceptíveis tem mais neutrófilos no lúmen uterino do que as resistentes. Interessantemente, tanto as éguas susceptíveis como as resistentes apresentaram um aumento na expressão do RNAm da IL-8 24 e 48 horas após a cobertura. No entanto, as éguas resistentes apresentaram um aumento menor em relação às susceptíveis que não se traduz em aumento de neutrófilos na citologia uterina, não ficando claro o porquê dessa expressão de RNAm da IL-8 não se correlacionar diretamente com os PMNs; uma possível explicação seria que as éguas susceptíveis possuem uma regulação de IL-8 diferente e uma migração neutrofílica

prejudicada pelas alterações degenerativas do tecido endometrial. Além disso, as contrações uterinas menos responsivas à inflamação podem minimizar a passagem de PMNs para o lúmen uterino resultando em uma migração mais lenta à medida que a atividade miometrial é reduzida nas éguas susceptíveis (TROEDSSON et al., 1993c; LeBLANC et al., 1994).

A maior persistência de PMNs, principalmente os degenerados, pode não ser uma diferença na resposta celular, mas um resultado da inflamação prolongada advinda também da maior expressão das IL-8 nas éguas susceptíveis e as diferenças na expressão das citocinas observadas entre os dois grupos de éguas ilustram as diferenças moleculares durante a resolução da inflamação. Esses dados corroboram os achados anteriores sobre a resposta imune local a um desafio intra uterino com espermatozoides mortos (FUMUSO et al., 2007) e vivos (FIORATTI, 2010) e a conclusão que as éguas susceptíveis são menos capazes de debelar o processo inflamatório uterino do que as éguas resistentes (TROEDSSON et al. 1993a; FUMUSO et al., 2006; WOODWARD et al., 2012). No entanto, os resultados são conflitantes entre diversos estudos nos quais as citocinas diferem e os momentos avaliados também.

A imunidade da mucosa pode ser caracterizada por alterações moleculares da expressão de RNAm de genes relevantes para a inflamação melhorando nossa compreensão da resposta imune inata. As diferenças observadas nos perfis de expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias sugerem que as éguas susceptíveis têm um retorno mais lento aos níveis pré-inseminação, possivelmente contribuindo para os sinais clínicos prolongados observados (ZENT et al., 1998).

As descobertas de que as éguas susceptíveis têm uma expressão gênica alterada apoiam outros dados que diferem entre éguas resistentes e susceptíveis na capacidade para eliminar a inflamação após um desafio bacteriano (TROEDSSON & LIU, 1991;

TROEDSSON et al., 1993c; LeBLANC et al., 1994). Embora os sinais clínicos de diferenciação entre as éguas resistentes e susceptíveis ser observados por vários dias após a inseminação é necessário elucidar a diferença no tempo da resposta imune uterina molecular entre as éguas resistentes e susceptíveis. Aparentemente a maior expressão das intelucinas ocorreu anteriormente aos momentos observados. No entanto, quando considerados os pontos de tempo estudados os dados sugerem que possa ser um momento que a susceptibilidade já tenha se desenvolvido, uma vez que há pequenas diferenças observadas entre as éguas susceptíveis e resistentes na expressão do RNAm das interleucinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α) e não foi verificada diferença na expressão da anti-inflamatória (IL-10). Dessa forma, 24 e 48 horas após a inseminação podem ser períodos tardios para identificar a diferença na resposta inflamatória, mas evidenciaram que o processo inflamatório continua ativo nas éguas susceptíveis. Além disso, a não resolução da inflamação induzida pela cobertura em tempo hábil pode ser devido a uma falha em mobilizar essas interleucinas inflamatórias durante um período mais precoce da inflamação resultando na sua persistência em éguas susceptíveis.

Os espermatozoides são realmente o componente do ejaculado que induz maior inflamação, com plasma seminal modulando a resposta inflamatória (TROEDSSON et al., 2005; , FIALA et al., 2007), não por induzir uma resposta celular, mas sim por coordenar a expressão de algumas interleucinas pró-inflamatórias. Estudos que utilizaram espermatozoides mortos sem plasma seminal para induzir a reação inflamatória indicaram que a presença das células mortas induz uma resposta mais intensa, talvez mais precoce, mas certamente mais rápida em sua resolução e por isso verificaram grandes diferenças na expressão das interleucinas. Contrariamente, espermatozoides viáveis com plasma seminal induzem uma resposta menos diferenciada

entre as éguas resistentes e susceptíveis e aparentemente mais branda e talvez por isso mais duradoura, exemplificando a função do plasma seminal em controlar a expressão das interleucinas de modo a não deixar a inflamação descontroladamente agressiva danificando o tecido uterino.

É importante determinar que as éguas são livres de inflamação antes da cobertura porque a cronicidade pode deslocar os perfis de expressão de RNAm das interleucinas antes da inseminação artificial alterando os resultados da quantificação relativa. Possivelmente há um efeito residual do ciclo estral anterior pois a expressão das interleucinas são numericamente diferentes, mesmo não sendo estatisticamente diferente, comprovando que o status uterino varia de acordo com a agressão anterior e uma inflamação molecular ainda pode estar ativa. Além disso, os dados demonstram que 24 e 48 horas podem ser tardios para ver a resposta inflamatória explicando as inconsistências deste estudo com os trabalhos publicados anteriormente uma vez que as éguas normais são destinadas a resolver a inflamação em 48 horas é plausível que às 24 horas após o desafio os neutrófilos não estejam sendo ativamente recrutados e embora ainda estejam presentes no útero (NASH et al., 2010b).

6.3. Citologia exfoliativa uterina

A IL-8 coordena o recrutamento de PMNs e outras células da imunidade inata para o sítio inflamado (CHAPWANYA et al., 2009). A cascata das citocinas inicia o recrutamento de células inflamatórias e é possível que um aumento da expressão precoce da IL-8 possa estar relacionado com o aumento dos PMNs observado neste estudo, uma vez que a IL-8 é pertencente a família das quimiocinas (LIU et al., 1997; TIZARD, 1998).

O processo inflamatório resultante do contato dos espermatozoides com o útero provoca alterações de permeabilidade dos vasos sanguíneos e liberação de fatores quimiotáxicos que resultam em migração de neutrófilos para o local agredido (PALM et al, 2006), adicionalmente foi constatado nesse estudo que a ovulação e a mudança no status hormonal são suficientes para permitir um pequeno influxo neutrofílico no útero. Outras possíveis causas para uma migração neutrofílica aguda além da presença dos espermatozoides são peneumovagina, refluxo de urina para dentro do útero e produção excessiva de muco (LeBLANC, 2010).

A presença de um agente agressor no útero provoca um contínuo recrutamento de neutrófilos para seu interior (LIU et al., 1986; TROEDSSON, 1999). Mas, no presente estudo foi verificado que anteriormente a cobertura havia pequena presença de neutrófilos no lúmen uterino e após a introdução do sêmen ocorreu intensa migração, concordando com Troedsson et al. (2001) que sugeriram que os espermatozoides funcionam como agentes quimiotáxicos para os PMNs.

Por outro lado, o plasma seminal é um agente supressor da atividade do sistema complemento, e por sua vez, da quimiotaxia pelos PMNs (TROEDSSON et al., 2000), porém a limpeza uterina foi superior quando o plasma seminal estava presente na inseminação artificial (TROEDSSON et al., 2008). Ao ser feita a infusão de plasma seminal constatou-se uma migração menos expressiva, concordando com Palm et al., (2008) que mostraram que o diluente a base de leite é mais quimiotáxico ao neutrófilo que o plasma seminal. Assim sendo, pode-se confirmar uma maior migração quando da inseminação artificial realizada juntamente com diluente a base de leite desnatado, ou seja, enquanto o plasma seminal induz uma inflamação endometrial transitória (PALM et al., 2008, FIALA et al., 2007) e amena ele também modifica a duração da intensidade da resposta imune celular ao espermatozoide, pois a duração da inflamação é mais curta

quando o plasma seminal está presente na dose inseminante do que quando ele é removido ou substituído por diluente (TROEDSSON et al., 2002). Dessa forma, nossos dados mostraram que o plasma seminal apresenta pouca quimiotaxia aos neutrófilos concordando com outros estudos onde o plasma seminal demonstrou função anti-inflamatória prevenindo a fagocitose e a ligação com os espermatozóides vivos, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos, a atividade do sistema complemento e desvencilhando os espermatozoides das extrusões de captura dos neutrófilos (TROEDSSON et al., 2000; TROEDSSON et al., 2001; TROEDSSON et al., 2006; ALAGHAMDI et al., 2004; ALGHAMDI & FOSTER, 2005) e com o avançar do ciclo estral a presença de neutrófilos na citologia exfoliativa diminuiu, mais rápido nas resistentes, mas também nas susceptíveis.

Os resultados citológicos mostraram o mesmo perfil da resposta neutrofílica entre as éguas resistentes e susceptíveis quando foi realizada uma inseminação artificial, concordando com relatos anteriores que também não constataram essa diferença (LIU et al., 1986; WILLIAMSON et al., 1987) ou com espermatozoides mortos (Woodward et al. 2013), em ambos estudos as éguas susceptíveis apresentarem maior quantidade de neutrófilos em comparação às resistentes.

Existem vários modos de interpretação das amostras citológicas colhidas do útero e métodos para sua colheita. No presente trabalho foi realizada a citologia exfoliativa e a classificação do processo inflamatório foi obtida pela relação entre células endometriais e neutrófilos conforme a classificação apresentada por Brook (1993). Kotilainen et al. (1994) relataram que em éguas resistentes não haviam neutrófilos presentes na citologia obtida pela técnica de lavado uterino com pequeno volume, mas outros autores relataram um baixo percentual de neutrófilos no mesmo tipo de animal (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 2000; CARD et al., 2004; FIORATTI,

2010), indicando desacordos na competência da técnica. Exatamente por isso, Walter et al. (2012) desenvolveram um estudo e demonstraram que a citologia exfoliativa é o método diagnótico mais sensível e específico para o exame citológico do útero da égua. Dessa forma, no presente estudo, por citologia endometrial exfoliativa, foi constatada a presença de neutrófilos anteriormente a inseminação artificial tanto para as éguas resistentes como para as susceptíveis. Porém, todas as éguas resistentes apresentaram citologia compatível com o aceitável para o estro enquanto apenas algumas das éguas susceptíveis apresentavam, nesse mesmo período, mais do que 5% de neutrófilos, indicando inflamação ativa, segundo Card (2005).

As éguas resistentes e as susceptíveis, mostraram um pequeno aumento de neutrófilos no lúmen uterino após a ovulação e após a infusão de plasma seminal, sendo esta resposta totalmente diferente daquela apresentada após a inseminação artificial. Para éguas cobertas, o pico inflamatório após a cobertura foi alcançado anterior a 24 horas. Nesse período a citologia apresentou resultado semelhante a inflamação ativa, fato observado utilizando-se a técnica de lavado uterino com pequeno volume (CARD et al., 2004) e por citologia exfoliativa (FIORATTI, 2010).

No presente experimento foi verificada alta porcentagem de neutrófilos 24 horas após a inseminação artificial com diminuição as 48 horas nas éguas resistentes e susceptíveis, sendo que as susceptíveis sempre mantêm maior número de neutrófilos no lúmen uterino por mais tempo. Porém, Woodward et al. (2013) verificaram que éguas susceptíveis tiveram um aumento no número de PMNs no tecido endometrial 2, 6, 12 e 24 horas após inseminação artificial e que para as éguas resistentes não houve diferença na infiltração neutrofílica, apenas uma tendência 2 e 6 horas após a cobertura com espermatozoides mortos. Além disso, foi verificada diferença entre as éguas

susceptíveis e resistentes as 2 e 12 horas após a cobertura, fato que denota diferença na resposta no início e no final do pico inflamatório.

Éguas com evidência de inflamação na avaliação citológica e contaminação bacteriana apresentaram menores taxas de prenhez, apesar da pequena correlação entre os testes. Ambas, citologia endometrial e cultura bacteriana são métodos diagnósticos utilizados para identificar as éguas com endometrite, pois as taxas de prenhez diminuem quanto maior a inflamação e a infecção. Entretanto, a citologia endometrial identificou duas vezes mais éguas com endometrite do que a cultura bacteriana, fato similar ao observado por Digby & Ricketts (1982), que relataram que 91% das éguas com evidência clínica de endometrite persistente apresentaram citologia compatível, mas somente 45% das amostras foi positiva na cultura (RIDDLE et al., 2007). Assim sendo, o presente trabalho focou com maior atenção os achados citológicos nos momentos avaliados, pois o perfil da resposta inflamatória traçado pela citologia endometrial exfoliativa foi semelhante para as éguas resistentes e susceptíveis a EPPC, uma vez que a relação neutrófilos/células endometriais apresentou semelhante redução ao longo do tempo para as duas classes de éguas. Porém, é importante ressaltar que o perfil semelhante na resposta neutrofílica do útero entre as éguas susceptíveis e resistentes, também verificado por Woodward et al. (2013), não exclui o fato de que as éguas susceptíveis sempre apresentaram essa resposta de forma exacerbada. Dessa forma, fica explícito que a resposta imune celular no útero, relacionada aos neutrófilos, é a mesma para ambos os grupos de éguas, mas que a solução desse processo difere entre os grupos, sendo mais tardia para as éguas susceptíveis.

A análise citológica realizada após inseminação artificial com sêmen congelado e com apenas seu diluente mostra um aumento da presença de neutrófilos apenas na fase inicial do processo inflamatório, porém a presença de espermatozoides torna essa

migração para o útero mais intensa (NASH et al., 2010b), mesmo perfil de resposta visualizado no presente estudo comparando sêmen diluído com plasma seminal e com ovulação sem desafio uterino.

O plasma seminal é considerado um modulador da inflamação. Os estudos *in vivo* relataram um papel pró-inflamatório do plasma seminal em comparação ao diluente, pois estimulou o influxo de neutrófilos para o lúmen uterino (PORTUS et al., 2005; PALM et al., 2008) e aumentou a expressão das interleucinas pró-inflamatórias (IL-1β e IL-6). A duração da inflamação é mais curta quando o plasma seminal está presente na dose inseminante do que quando é removido ou substituído por diluente (TROEDSSON et al., 2002). Assim, os resultados do presente estudo demonstraram que o plasma seminal foi incapaz atuar como quimiotáxico aos neutrófilos não aumentando de maneira expressiva a migração dessas células ao útero. O número de PMNs encontrado no útero 24 horas após a IA foi significativamente menor quando o plasma seminal foi mantido na inseminação e ao se realizar uma IA somente com plasma seminal foi detectada uma grande infiltração de PMNs no estrato compacto do endométrio, porém a limpeza uterina foi superior quando o plasma seminal estava presente (TROEDSSON et al., 2008).

Outra aparente função do plasma seminal seria proteger o espermatozoide de ser fagocitado pelos PMNs. Quando as éguas são cobertas pela segunda vez dentro de 24 horas, o sêmen da segunda IA é introduzido em um ambiente inflamado que se torna deletério a sua motilidade. Dados sugerem que o plasma seminal protege seletivamente os espermatozoides viáveis, mas não os mortos, de se ligarem e serem fagocitados pelo PMNs (TROEDSSON et al., 2000, TROEDSSON et al., 2005) e que algumas proteínas do plasma seminal são ativas na proteção e eliminação dos espermatozoides do útero porque favorecem a ligação dos neutrófilos aos espermatozoóides em apoptose

(TROEDSSON et al., 2006). Dessa forma, foi comprovado por Doty et al. (2011) que o componente proteico do plasma seminal responsável por inibir a ligação neutrófilo espermatozoide viável favorencendo o transporte das células íntegras ao sítio de fertilização é uma proteína chamada CRISP-3.

6.4. Ultrassonografia uterina

As éguas susceptíveis e resistentes não apresentaram acúmulo de líquido no lúmen uterino durante o estro e antes de qualquer tipo de desafio ao útero, corroborando os achados de Bucca et al. (2008) que verificaram que algumas éguas susceptíveis não apresentaram essa característica. Entretanto, a ovulação e a mudança no *status* hormonal é capaz, assim como o desafio do útero com plasma seminal ou com sêmen fresco diluído, de provocar uma exsudação uterina em todas as éguas. Ainda, extendendo o exame até 48 horas após o desafio fica marcante a diferença na limpeza do conteúdo, sendo que as éguas susceptíveis o mantêm e as resistentes praticamente eliminaram todo o líquido visível no lúmen uterino.

A limpeza uterina atrasada é de origem multifatorial sendo a reduzida atividade contrátil do miométrio o principal fator desencadeante (TROEDSSON & LIU, 1991). Diversos autores constataram diferença entre as éguas susceptíveis e resistentes quanto a remoção mecânica do conteúdo uterino devido a variações contráteis do miométrio (REITZENSTEIN et al., 2002; RIGBY et al., 2001; NIKOLAKOPOULOS et al., 2000b; TROEDSSON et al., 1993c). No presente estudo foi observado no exame ultrassonográfico que as éguas susceptíveis acumulam maior quantidade de líquido no interior do útero quando comparadas as éguas resistentes, as 24 e principalmente 48 horas após a infusão com plasma seminal ou inseminação artificial.

O exame ultrassonográfico para avaliação da retenção de fluído uterino é uma ferramenta muito útil para o diagnóstico da endometrite podendo graduar essa inflamação baseada no volume e ecogenicidade (McKINNON et al., 1988). Porém, cuidados devem ser tomados na tentativa de quantificar o acúmulo do fluido uterino, pois a manipulação do trato reprodutivo pode alterar os resultados (WOODWARD & TROEDSSON, 2012; FIORATTI, 2010). Entretanto, a combinação do exame ultrassonográfico com o citológico pode ser uma uma forma mais prática e acurada de avaliar o endométrio (CARD, 2005)

7. CONCLUSÕES

- As catelicidinas estão presentes em diversas quantidades no plasma seminal de garanhões.

- As éguas resistentes demonstraram maior capacidade de remoção do líquido intra uterino do que as classificadas como susceptíveis, independente se foi realizada infusão de plasma seminal, inseminação artificial com sêmen fresco diluído ou se o útero não foi desafiado.

- As éguas susceptíveis mostraram que a presença de espermatozoides no lúmen uterino induz um atraso na remoção de líquido ali presente.

- A expressão relativa do RNAm da IL-1β nas células endometriais estava aumentada nas éguas susceptíveis e é induzida pelo plasma seminal e pelos espermatozoides.

- A expressão relativa do RNAm da IL-6 nas células endometriais é maior nas éguas susceptíveis e o plasma seminal aumenta sua expressão 24 horas após sua infusão.

- As éguas resistentes não demonstraram diferença na expressão relativa do RNAm da IL-6 nas células endometriais independente de tempo ou desafio ao útero.

- A expressão relativa do RNAm da IL-8 nas células endometriais é maior nas éguas susceptíveis.

- A presença de espermatozoides no útero apenas aumenta a expressão relativa do RNAm da IL-8 nas células endometriais das éguas resistentes 24 horas após a inseminação artificial com sêmen fresco diluído.

- A expressão relativa do RNAm da IL-10 nas células endometriais é semelhante entre as éguas resistentes e susceptíveis.

- O plasma seminal induz maior expressão relativa do RNAm da IL-10 nas células endometriais das éguas suceptíveis 24 horas após sua infusão.

- Espermatozoides foram capazes de induzir maior expressão relativa do RNAm da IL-10 nas células endometriais das éguas resistentes 48 horas após a inseminação artificial.

- O plasma seminal induz maior expressão relativa do RNAm do TNF-α e os espermatozoides induzem uma diminuição as 48 horas após o desafio em éguas susceptíveis.

- Há uma forte correlação entre as interleucinas 6 e 8 nas éguas susceptíveis e 6, 8 e 10 nas éguas resistentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.** v.127, p. 593-600, 2004.

ALGHAMDI, A.S.; FOSTER, D.N., 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. **Am. J. Reprod. Immunol**., v.53, p.230-237, 2005.

ALGHAMDI, A.S. & FOSTER, D.N. Seminal DNase free spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. **Biol. Reprod.** v.73, p.1174–81, 2005.

ANDERSON, E.; SORENSEN, O.E.; FROHM, B.; BORREGAARD, N.; EGESTEN, A.; MALM, J. Isolation of human cationic antimicrobial pretein-18 from seminal plasma and its association with prostassomes. **Human Reproduction**, v.17, p. 2529-2534, 2002.

ASBURY, A.C.; SCHULTZ, K.T.; KLESIUS, P.H.; FOSTER, G.; WASHBURN, S.M. Factors affecting phagocytosis of bacteria and neutrophils in the mare uterus**. J. Reprod. Fert. Suppl.** v.32, p.151-159, 1982.

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

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

BALS, R., WANG, X., ZASLOFF, M. AND WILSON, J.M. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. ***Proc. Natl Acad. Sci.****USA*, v.95, p. 9541–9546, 1998.

BARTON, B.E., JACKSON, J.V. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. **Infection and Immunity.** v.61, p. 1496-9, 1993.

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

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

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.

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

BROOK, D. Uterine cytology. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. p.246–253, 1993.

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

BRUHN, O.; GROTZINGER, J.; CASCORBI, I., JUNG, S. Antimicrobial peptides and proteins of the horse – insights into a well-armed organism. **Veterinary Research.** v.42, n.98, p. 1-22, 2011.

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,** v.70, p.1093-1100, 2008.

CAMPBELL, M.H.L.; ENGLAND, G.C.W. Effect of teasing, mechanical stimulation and the intrauterine infusion of saline on uterine contractions in mares. **Vet. Rec.,** v.155, p. 103-110, 2004.

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.

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

CARD, C.E.; CARLEY, S.D.; GREEN, J.; CHIRINO-TREJO, M. Endometrial cytology in mares bred with frozen semen. **In: Proceedings of the 50th AAEP**. p.505-9, 2004.

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

CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq. Bras. Endoc. Metab.** v.50, p.304-312, 2006.

CHAPWANYA, A.; MEADE, K.G.; DOHERTY, M.L.; CALLANAN, J.J.; MEE, J.F.; O'FARRELY, C. Histopathological and molecular evalution of Holstein-Friesian cows

postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology,** v.71, p. 1396-1407, 2009.

CHEUNG, A.T.; LIU, I.K; WALSH, E.M., MILLER, M.E. Phagocytic and killing capacities of uterine-derived polymorphonuclear leukocytes form mares resistant and susceptible to chronic endometritis. **Am. J. Vet. Res.** v.46, p. 1938-40, 1985.

CHRISTOFFERSEN, M.; BAAGOE, C.D.; JACOBSEN, S.; BOJESEN, A.M.; PETERSEN, M.R.; LEHN-JENSEN, H. 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. **Vet Immunol Immunopathol** 2010;138:95–105.

CHRISTOFFERSEN, M.; WOODWARD, E.M.; BOJESEN, 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.** v.78, p.991–1004, 2012a.

CHRISTOFFERSEN, M.; WOODWARD, E.; PETERSEN, M.R.; BOJESEN, A.; JACOBSEN, S.; TROEDSSON, M.H.T. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC. Vet. Res.** v.8, p.41-48, 2012b.

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

CYKTOR, J.C., TURNER, J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. **Infection and Immunity.** v.79, p. 2964-73, 2011.

DEAN, S.N.; BIHOP, B.M., van HOEK, M.L. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against Staphylococcus aureus. **BMC Microbiology** v.11, p.114-26, 2011.

DELL'AQUA JUNIOR, J.A. **Efeito da cortico-terapia e plasma seminal na resposta inflamatória e fertilidade de éguas submetidas à inseminação artificial**. Botucatu, 2004. 120p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

DIAO, H., KOHANAWA, M. Endogenous interleukin-6 plays a crucial protective role in streptococcal toxic shock syndrome via suppression of tumor necrosis factor a production. **Infection and Immunity.** v.73, p. 3745-48, 2005.

DIGBY, N.J.W.; RICKETTS, S.W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. v.32, p.181-5, 1982.

DOTY, A.; BUHI, W.C.; BENSON, S.; SCOGGIN, K.E.; POZOR, M.; MACPHERSON, M.; MUTZ, M., TROEDSSON, M.H.T. Equine CRISP3 Modulates

Interaction between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. **Biol. Reprod.** v.85, p.157-64, 2011.

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. Efeito dos anti-inflamatórios esteróides na reação inflamatória e na fertilidade de éguas normais e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial. Botucatu, 2010. 141p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

FISCHER, B. & BEIER, H.M. Uterine environment in early pregnancy. In: SCREENAN, J.M.; DISKIN, M.G. **Embryonic mortality in farm animals.** The Netherlands: Martinus Nijohoff Publishers, 1986. p.93-108.

FROHM NILSSON, M., SANDSTEDT, B., SORENSEN, O., WEBER, G., BORREGAARD, N. AND STAHLE-BACKDAHL, M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. **Infect. Immun.**, v.67, p. 2561–2566, 1999.

FUMUSO, E.A.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.; BOWDEN, R.A. Endometrial IL-1β, IL-6 nad TNF-α, mRNA expression in mares

resistant or susceptible to post-breeding endometritis and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 31-41, 2003.

FUMUSO, E.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; DAVID, S.; 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.A.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant or susceptible to 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.

GARTON, N.J.; GILLERON, M.; BRANDO. T; DAN, H.H.; GIGUÈRE, S.; PUZO, G.; PRESCOTT, J.F., SUTCLIFFE, I.C. A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen rhodococcus equi. **The Journal of Biological Chemistry.** v.277, n.35, p. 31722-33, 2002.

GRUBOR, B.; MEYERHOLZ, D.K.; ACKERMANN, M.R. Collectins and Cationic Antimicrobial Peptides of the Respiratory Epithelia. **Veterinary Pathology.** v.43, p. 595-612, 2006.

HAKANSSON, A.; ALBIHN A.; MAGNUSSON, U. The contribution of complement to opsonic activity in the uterine secretions of mares free of endometritis. **Theriogenology.** v.39, p.601-609, 1993.

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.

HOROHOV, D.W.; SINATRA, S.T.; CHOPRA, R.K.; JANKOWITZ, S.; BETANCOURT, A; BLOOMER, R.J. The Effect of Exercise and Nutritional Supplementation on Proinflammatory Cytokine Expression in Young Racehorses During Training. **JEVS.** v.32, n.12, p. 805-815, 2012.

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

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. Onset and duration of the uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. In: Biology of Reproduction Monograph Series 1: **Equine reproduction** VI; 1995, p.515-7.

KATILA, T. Uterine defense mechanisms in the mare. **Anim. Reprod. Sci.** v.42, p.197–204, 1996.

KENNEY, R.M., DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: Marrow D. **Currenty therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals.** 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; p. 723-9, 1986.

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

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.

KOTILAINEN, T.; HUHTINTN, M.; KATILA, T. Sperm induced leukocytosis in the equine uterus. Theriogenology. 41, 629-636, 1994.

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.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A., MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics.** v.6, 2005.

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. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post–Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reprod. Dom. Anim.,** Suppl. 2, v.45, p.21-7, 2010.

LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, A.C,; TRAN, T.; MAURAGIS, D., KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Veterinary Journal**. v.26, p. 109-1313, 1994.

LEFRANC, A.C., ALLEN, W.R. Uterine fluid accumulation and endometrial integrity in the barren mare. **Pferdeheilkunde, v**.24. p.27-30, 2008.

LIU, I.K.M.; CHEUNG, A.T.; WALSH, E.M.; MILLER, M.E., LINDENBERG, P.M. Comparison of peripheral blood and uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis: chemotactic and cell elastimetry analysis. **Am. J. Vet. Res.** v.46, p. 917-20, 1985.

LIU; I. K. M.; CHEUNG; A. T. W.; WALSH, E.M.; AYIN; S. The Functional Competence of Uterine-derived Polymorphonuclear Neutrophils (PMN) from Mares Resistant and Susceptible to Chronic Uterine Infection: A Sequential Migration Analysis. **Biol. Reprod.** v.35, p.1168-74, 1986.

LIU, I.K.M.; RAKESTRAW, P.A.; COIT, C.; HARMON, F., SNYDER, J. An in vitro investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility. **Pferdeheilkunde.** v.13, p. 557, 1997.

LUDWIG, S.; SCHOON, D.; AUPPERLE, H.; von REISWITZ, A., SCHOON, H.A. Angiopathies in the equine endometrial biopsy – a marker for extrauterine vascular lesions? **Pferdeheilkunde.** v.17, p. 608-14, 2001.

MALM, J., SORENSEN, O., PERSSON, T., FROHM-NILSSON, M., JOHANSSON, B., BJARTELL, A., LILJA, H., STAHLE-BACKDAHL, M., BORREGAARD, N. AND EGESTEN, A. The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. **Infect. Immun.**, v.68, p. 4297–4302, 2000.

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.; HARRISON, L.A.; BLACH, E.L., SHIDELER, R.K. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles**. J. Am. Vet. Med. Assoc**. v.192, p350-3, 1988.

MCRAE, A.C. The blood-uterine lumen barrier and exchange between extracelular fluids. **J. Reprod. Fert.,** v.82, p.857-873, 1988.

MOIRA, K.O. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. **Fertil. Steril**.,v.70, n.6, p.1143-1147, 1998.

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.

MOR, A. Multifunctional host defense peptides: antiparasitic activities. **FEBS J**., v.276, n.22, p. 6474-82, 2009.

NASH, D.M.; SHELDON, I.M.; HERATH, S.; LANE, E.A. Endometrial Explant Culture to Study the Response of Equine Endometrium to Insemination. **Reprod. Dom. Anim.** v.45, p.670–676, 2010a.

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.

NIELSEN, J.M. Edometritis in mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology.** v.64, p. 510-8, 2005.

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

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

NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H.; GILBERT, C.L.; GOODE; WATSON, E.D. Release of Oxytocin and Prostaglandin F2α around teasing, natural service and associated events in the mare. **Anim. Reprod. Sci.,** v.63, p.89-99, 2000b.

NIYONSABA, F.; IWABUCHI, K.; SOMEYA, A.; HIRATA, M.; MATSUDA, H.; OGAWA, H.; NAGAOKA. I. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. **Immunology**, v.106, p. 20-26, 2002.

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 the PMN migration and on expression of IL-1β, IL-6, TNF-α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. **Theriogenology**, v.70, p.843-851, 2008.

PARK, I.Y.; HUI-YUAN, Y.; CHIH-HSIUNG, T.; BAK-SAU, Y.; HENG-LI, C.; HSI-TSUNG, C.; KUO-CHUN, H.; HSIU-JUNG, L., JYA-WEI, C. Helix stability confers salt resistance upon helical antimicrobial peptides. **J. Biol. Chem**. v.279, n.14, p. 13896-901, 2004.

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

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.

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. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice. **Theriogenology.** v.68, p. 395-402, 2007.

RIGBY, S.L.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R.C.; COLLERAN, P.; THOMPSOM, 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 Intrinsec Defect in Myometrial Function. **Biol. Reprod.,** v.65, p.740-747, 2001.

SCHLAFER, D.H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology.** v.68, p.413-22, 2007.

SCOCCHI, M.; BONTEMPO, D.; BOSCOLO, S.; TOMASINSIG, L.; GIULOTTO, E.; ZANETTI, M. Novel cathelicidins in horse leukocytes. **FEBS Letters**, v.457, p. 459-464, 1999.

SINNEMAA, L.; JARVIMAA, T.; LEHMONEN, N.; MAKELA, O.; REILAS, T.; SANKARI, S.; KATILA, T. Effect of insemination volume on uterine contractions and inflammatory response and on elimination of sperm in the mare uterus – scintigraphic and ultrasonografic studies. **J. Vet. Med. Assoc.,** v.52, p.466-471, 2005.

SKERLAVAJ, B.; SCOCCHI, M.; GENNARO, R.; RISSO, A.; ZANETTI, M. Structural and Functional Analysis of Horse Cathelicidin Peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 715-722, 2001.

SORENSEN, O.; COWLAND, J.B.; ASKAA, J, BORREGAARD, N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. **J. IMMUNOL. METHODS**. v.206, p.53-9, 1997.

SORENSEN, O.E.; GRAM, L.; JONHSEN A.H.; ANDERSON, E.; BANGSBOLL, S.; TJABRINGA, G.S.; HIEMSTRA, P.S.; MALM, J.; EGESTEN, A.; BORREGAARD, N. Processing of Seminal Plasma hCAP-18 to ALL-38 by Gastricsin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p. 28540-6, 2003.

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

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

TROEDSSON, M.H.T. Uterine response to semen deposition on the mare. In: **Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology.** p.130-135, 1995.

TROEDSSON, M.H.T. Diseases of the uterus. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine.** 4.ed. Philadelphia: W.B Saunders, 1997. p.517-524.

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

TROEDSSON, M.H.T., LIU, I.K.M. Uterine clearance of non-antigenic markers (51Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**. v.44, p. 283-8, 1991.

TROEDSSON, M.H.T.; DEMORAES, M.J.; LIU, I.K.M. Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical response to intra-uterine exposure to *Streptococcus zooepidemicus*. **Am. J. Vet. Res.** v.54, p.570-572, 1993a.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; THURMOND, M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. **Biol Reprod.** v.49, p. 507-14, 1993b.

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. **Journal of Reproduction and Fertility.** v.99, p. 307-13, 1993c.

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.; LEE, C.S.; FRANKLIN, R.; CRABO, B.G. The role of seminal plasma in post breeding uterine inflammation: the role of seminal plasma. **J. Reprod. Fert.,** v.56, p.341-9, 2000.

TROEDSSON, M.H.T.; LOSETH, K.; ALGHAMDI, A.M.; DAHMS, B., CRABO, B.G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Anim. Reprod. Sci.,** v.68, p.273-278, 2002.

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

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; HENSEN, P.J., BUHI, W.C. Equine seminal plasma proteins protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotoc and dead spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** v.94, p.60–61, 2006.

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

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.** v.132, p.178-86, 2012.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C., KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology.** v.28, n.5, p. 709-23, 1987.

WATSON, E.D.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. Cellular and humoral mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. **Vet. Immunol. Immunopath.** v.6, p. 107-121, 1987.

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

WILLIAMSON, P.; MUNYA, S.; MARTIN, R., PENHALE, J. Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl. v.35, p.317-325, 1987.

WOODWARD, E.M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.R.; SQUIRES, E., TROEDSSON, M.H.T. Susceptibillity to persistent breeding induced endometritis: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology.** v.78, p.495-501, 2012.

WOODWARD, E.M. & TROEDSSON, M.H.T. Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. **JEVS.** Article in press, p.1-10, 2012.

WOODWARD, E.M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.R.; BETANCOURT, A.; HOROHOV, D.; SCOGGIN, K.E.; SQUIRES, E.L., TROEDSSON, M.H.T. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**. v.145, p. 289-96, 2013.

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 inflamatory responses. **J. Clin. Invest.** v.101, p. 311-20, 1998.

ZANETTI, M.; GENNARO, R.; ROMEO, D. Cathelicidins: a novel family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. **FEBS Letters**, v.374, p. 1-5, 1995.

ZANETTI, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v.75, p. 39-46, 2004.

ZENT, W.W.; TROEDSSON, M.H.T., XUE, J.L. Post-breeding uterine fluid accumulation in a normal population of thoroughbred mares: a field study. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, v.44, p.64-65, 1998.

ZERBE, H.; SCHUBERTH, H.J.; ENGELKE, F.; FRANK, J.; KLUG, E., LEIBOLD, W. Development and comparison of *in vivo* and *in vitro* models for endometritis in cows and mares. **Theriogenology.** v.60, p. 209-23, 2003.

Trabalho a enviado para a revista

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.
2. Os **artigos científicos**, **revisões** e **notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem**.
3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo .doc, .pdf).
4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo .doc, .pdf).
5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão**. (Modelo .doc, .pdf).
6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.
7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.
8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).
9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.
9.1. Citação de livro:
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.
TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.
9.2. Capítulo de livro com autoria:
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.
9.3. Capítulo de livro sem autoria:
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:
O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:
MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum***(Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.
PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de ***Sitophilus oryzae*** (L.), ***Cryptolestes ferrugineus*** (Stephens) e ***Oryzaephilus surinamensis*** (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural** , Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.
9.5. Resumos:
RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.
9.6. Tese, dissertação:
COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas caracterísitcas digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.
9.7. Boletim:
ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).
9.8. Informação verbal:
Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.
9.9. Documentos eletrônicos:
MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.
GRIFON, D.M. Artroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic.**Proceedings…** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1
UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: http://www.zh.com.br/especial/index.htm
ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen.**Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm
MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.
10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.
11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).
14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Estudo da resposta inflamatória pós-inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistentes pós-cobertura

Eduardo Gorzoni Fioratti[1], Marco Antonio Alvarenga[1]

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Algumas éguas apresentam uma reação inflamatória após a cobertura de modo exacerbado e contínuo agredindo o tecido uterino e diminuindo a fertilidade. O objetivo desse estudo foi verificar e caracterizar a resposta imune uterina. O plasma seminal e o sêmen fresco diluído foram obtidos por coleta de sêmen de 15 garanhões. As éguas foram submetidas a um ciclo estral sem desafio uterino (T1), com infusão de plasma seminal (T2) e inseminação artificial (T3). Exame ultrassonográfico e citologia exfoliativa uterina foram realizados durante 3 ciclos consecutivos aleatoriamente, 24 (M1), 48 (M2) e 72 horas (M3) após a indução da ovulação. No momento M2 não foi possível diferenciar as éguas resistentes das susceptíveis pela citologia ou ultrassonografia independente da infusão com plasma seminal, inseminação artificial ou da ovulação, mas quando há presença de espermatozoides no útero a resposta inflamatória é mais intensa. Durante o momento M3, as éguas susceptíveis apresentaram maior volume de fluido uterino acumulado em todos os tratamentos com menor capacidade de limpeza uterina.

Palavras-chave: Equino, endometrite, ultrassonografia uterina, citologia exfoliativa

ABSTRACT

In the equine species occurs a persistant post-breeding endometritis wich is harmfull to the uterus and minimizes the fertility. The objective was to verify the uterine immune response. Seminal plasma and diluted semen were obtained by semen collection of 15 stallions. Three experiments were designed to mares, during baseline (T1), after seminal plasma infusion (T2) and artificial insemination (T3). Endometrial cytology and as well as ultrassonographic evaluations were performed to access data during three randomly assigned consecutive estrous cycles, 24 (M1), 48 (M2) and 72 hours (M3) after an ovulation was induced. At M2, resistant and susceptible mares could not be separated through cytology or ultrassonography, even though the presence of sperm strongly stimulates uterine inflammatory reaction. At M3, susceptible mares showed higher uterine fluid accumulation and lower uterine clearance.

Key-words: Equine, endometritis, uterine ultrassonografy, exfoliative cytology

1. INTRODUÇÃO

Após a cobertura de uma égua ocorre uma inflamação fisiológica e transitória que serve para limpeza do excesso de espermatozóides mortos e de outros contaminantes uterinos advindos da deposição do sêmen. Essa inflamação é causada principalmente pela presença das células espermáticas no útero e se caracteriza pela rápida infusão de neutrófilos uma hora após a detecção da presença dos espermatozóides e pela formação de um exsudato intrauterino (Card, 2005; Troedsson et al., 1998; Troedsson, 1999).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Colheita de sêmen e preparo das doses

Foram utilizadas 10 éguas sem qualquer tipo de alteração anatômica no aparelho reprodutivo, com idade inferior a 10 anos, citologia negativa para inflamação ativa durante o estro, sem histórico de baixa fertilidade e sem acúmulo de líquido pós IA que persista além de 48 horas; e 10 éguas susceptíveis a endometrite persistente pós cobertura, selecionadas pelo histórico de baixa fertilidade e com idade acima de 14 anos, citologia negativa para inflamação ativa durante o estro, pobre conformação perineal e útero projetado na cavidade abdominal, acúmulo de líquido intra-uterino e citologia de inflamação ativa pós IA persistente por mais de 48 horas após a cobertura. Imediatamente após a remoção da fração gel foi realizada uma diluição desse sêmen na proporção de 1:1 com diluidor a base de leite desnatado (Botusemen®, Botupharma, Brasil).

Após essa diluição prévia, a concentração foi mensurada com uso da câmara de Neubauer e foi separada uma dose contendo 1 x 10^9 espermatozóides totais. A motilidade espermática foi mensurada com uma gota de 10 µL de sêmen diluído colocada em câmara de Makler pré aquecida (100 µm de profundidade) a 38°C e avaliada por análise computadorizada (CASA, HTM – IVOS 12; Hamilton Thorne Research, Beverly, MA) no modo ajustado para eqüinos. Após as análises laboratoriais a dose inseminante foi rediluída para o volume final de 20 mL, sempre respeitando o intervalo de concentração espermática para transporte de 25 a 50 milhões de espermatozóides/ mL (Varner et al., 1987).

Todas as éguas tiveram seus ciclos estrais acompanhados por palpações retais e ultrassonografia e randomicamente passaram pelos 3 tratamentos propostos. Um ciclo estral fisiológico, ou seja, acompanhamento da ovulação sem infusão uterina de plasma seminal ou IA, sendo por isso considerado como ciclo controle (T1); outro ciclo com infusão uterina de 20 mL de plasma seminal (T2) e mais um ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com 20 mL de sêmen fresco diluído (T3).

Para isso, ao se detectar um folículo de 35mm e um edema uterino de grau 2 as éguas tiveram as ovulações induzidas com 1mg de acetato de deslorelina (I.M.) e cada animal foi então inseminado ou infundido de plasma seminal apenas uma vez por ciclo com o volume total previamente estabelecido, nos ciclos em que a ovulação não ocorria dentro do período desejado (entre M1 e M2) as colheitas eram descartadas e o ciclo estral desconsiderado.

2.2. Momentos de coleta de material

Momento 1 (M1): 24 horas após a indução da ovulação, ou seja, imediatamente anterior a infusão de plasma seminal ou da IA, dependendo de qual tratamento seria

usado no ciclo estral. **Momento 2 (M2):** Vinte e quatro horas após o momento 1. **Momento 3 (M3):** quarenta e oito horas após o momento 1.

2.3. Ultrassonografia uterina

O exame ultrassonográfico foi realizado com transdutor linear de freqüência de 5Mhz (Pie Medical, Aquila, Esaote). Todo o útero foi pesquisado para presença de acúmulo de líquido nos três momentos previamente estabelecidos e será levado em consideração o *status* uterino no momento da inseminação artificial. As medições foram realizadas na área da bifurcação entre o corpo e os cornos uterinos nos momentos propostos e os achados ultrassonográficos classificados de acordo com a altura da coluna de líquido acumulado.

2.4. Citologia uterina

Seguidas as palpações retais e após a higienização da região perineal foi realizada a coleta da citologia uterina exfoliativa, essas foram feitas com auxílio de um aparelho para coleta de citologia uterina equina que tinha a função de proteger a escova ginecológica do contato com o ambiente vaginal e cervical da fêmea e facilitar sua entrada no útero conforme descrito por Alvarenga e Iwana de Matos (1990). Esse procedimento foi realizado e a escova ginecológica foi utilizada para confecção das lâminas as quais secaram em temperatura ambiente e posteriormente foram coradas em Panótico Rápido (Laborclin, Brasil). A leitura das amostras foi feita em microscopia óptica em aumento de 1000x (imersão) considerando o número de neutrófilos/ células endometriais, foram examinadas um total de 200 células por lâmina de forma aleatória sendo essas classificadas de acordo com exposto por Nielsen (2005).

2.5. Análise Estatística

Para os parâmetros medição da coluna de líquido acumulado na área da bifurcação uterina foi realizada análise de covariância para as respostas nos tempos 24 e 48 horas para estudar o efeito do plasma seminal e da inseminação artificial no útero das éguas, e da classe das éguas (resistentes e susceptíveis), considerando a resposta no momento 1 como variável auxiliar. Para se analisar os dados obtidos a partir do exame citológico foi usado ANOVA e depois Tukey quando houve diferença estatítica, utilizando as medidas do momento 1 como variável auxiliar.

Todos os parâmetros foram analisados com nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1. Ultrassonografia uterina

Na avaliação do conteúdo uterino por ultrassonografia não foi verificada presença de líquido no lúmen uterino de nenhuma égua no momento 1 de avaliação em todos tratamentos aplicados. Além disso, foi constatado que no momento 2 não ocorreu diferença estatística ($p>0,05$) entre as éguas resistentes e susceptíveis. Porém, no momento 3 as éguas resistentes apresentavam, quando comparadas as susceptíveis ($p<0,003$), menor quantidade de líquido acumulado na região da bifurcação dos cornos uterinos. Adicionalmente, ao se efetuar as análises dentro de cada momento e grupo de éguas não foi verificada diferença estatística ($p>0,05$) (Figura 1).

Por outro lado, no ciclo controle (T1) das éguas susceptíveis foi verificado que com o passar do tempo a redução do líquido acumulado no lúmen uterino foi maior

quando comparado ao ciclo em que foi realizado a infusão uterina de plasma seminal ($p<0,05$) e ao ciclo da inseminação artificial ($p<0,002$) no qual foi verificado um leve aumento. Entretanto, para as éguas resistentes foi verificado que a capacidade de remoção do líquido acumulado no momento 2 foi estatisticamente a mesma ($p>0,05$) independentemente se foi realizada a infusão de plasma seminal ou a inseminação artificial ou ainda se o útero não sofreu nenhum desafio (controle). Os dados estão apresentados na tabela 1.

3.2. Citologia exfoliativa uterina

A porcentagem de neutrófilos em relação às células endometriais nas amostras de citologia exfoliativa uterina não indica uma diferença estatística entre as éguas resistentes e susceptíveis a EPPC ($p>0,05$) no que diz respeito a resposta neutrofílica dentro do período estudado. Além disso, as interações do útero com plasma seminal e do útero com os espermatozóides seguem o mesmo padrão para as éguas resistentes e susceptíveis ($p>0,05$).

Isoladamente, para as éguas resistentes foi constatado que no momento 1 os diversos tratamentos não apresentaram diferença entre si ($p=0,1246$) e ao considerarmos o momento 2 também não se pode verificar diferença estatística entre os tratamentos 1 e 2 ($p=0,119$), ou seja, o plasma seminal não induziu uma migração neutrofílica maior do que aquela que aconteceria num ciclo estral sem cobertura (controle). Porém, quando foi realizada a inseminação artificial (T3) o útero tornou-se permissivo à migração neutrofílica, uma vez que foi detectada diferença estatística ($p<0,01$) ao ser comparado com os tratamentos 1 e 2. Adicionalmente, ao ser analisado o momento 3 foi verificada a mesma situação do momento 2, ou seja, não há diferença entre os tratamentos 1 e 2 ($p=0,1285$), mas ao ser comparado ciclo controle com inseminação artificial (T1 *vs* T3, $p<0,01$) ou infusão de plasma seminal com inseminação artificial (T2 *vs* T3, $p<0,01$) foi detectada diferença na migracão neutrofílica (Figura 2A).

Conforme mencionado anteriormente, a resposta imune celular uterina a presença do plasma seminal ou ao sêmen diluído em diluidor a base de leite desnatado das éguas susceptíveis é semelhante aquela observada nas éguas resistentes nos tres momentos estudados, uma vez que para o momento 1 também não ocorreu diferença entre os tratamentos propostos ($p=0,3498$); para o momento 2 a infusão de plasma seminal não foi suficiente em induzir a migração neutrofílica, pois não há diferença quando comparada ao ciclo controle ($p=0,1246$), entretanto a presença dos espermatozóides induz realmente uma migração de neutrófilos superior aquela vista no ciclo controle ($p<0,01$) ou no ciclo onde foi realizada a infusão uterina de plasma seminal ($p<0,01$). Além disso, os resultados visualizados no momento 3 não mostraram diferença entre os tratamentos 1 e 2 ($p=0,0872$), mas entre os tratamentos 1 e 3 ($p<0,01$) e entre os tratamentos 2 e 3 ($p<0,01$) foi constatada a maior presença de neutrófilos no lúmen uterino (Figura 2B).

4. DISCUSSÃO

4.1 Citologia exfoliativa uterina

O processo inflamatório resultante do contato dos espermatozóides com o útero provoca alterações de permeabilidade dos vasos sanguíneos e liberação de fatores quimiotáticos que resultam em migração de neutrófilos para o local agredido (Palm et al, 2006), adicionalmente foi constatado nesse estudo que a ovulação e a mudança no

status hormonal são suficientes para permitir certo influxo neutrofílico para o útero. Outras possíveis causas para uma migração neutrofílica aguda além da presença dos espermatozóides são peneumovagina, refluxo de urina para dentro do útero e produção excessiva de muco (LeBlanc, 2010).

A presença de um agente agressor no útero provoca um contínuo recrutamento de neutrófilos para seu interior (Liu et al., 1986; Troedsson, 1999). Mas, no presente estudo foi verificado que anteriormente a cobertura havia pequena presença de neutrófilos no lúmen uterino e após a introdução do sêmen ocorreu intensa migração deles, concordando com Troedsson et al. (2001) que sugeriram que os espermatozóides funcionam como agentes quimiotáticos para os PMNs.

Por outro lado, o plasma seminal é um agente supressor da atividade do sistema complemento, e por sua vez, da quimiotaxia pelos PMNs (Troedsson et al., 2000), porém a limpeza uterina foi superior quando o plasma seminal estava presente na inseminação artificial (Troedsson et al., 2008). Ao ser feita a infusão de plasma seminal constatamos uma migração menos expressiva, concordando com Palm et al., (2008) que mostraram que o diluidor a base de leite é mais quimiotáxico ao neutrófilo que o plasma seminal, assim sendo, podemos confirmar uma maior migração quando da inseminação artificial realizada juntamente com diluidor a base de leite desnatado, ou seja, enquanto o plasma seminal induz uma inflamação endometrial transitória (Palm et al., 2008, Fiala et al., 2007) e amena ele também modifica a duração da intensidade da resposta imune celular ao espermatozóide, pois a duração da inflamação é mais curta quando o plasma seminal está presente na dose inseminante do que quando ele é removido ou substituído por diluente (Troedsson et al., 2002). Dessa forma, nossos dados mostram que o plasma seminal apresenta pouca quimiotaxia aos neutrófilos concordando com outros estudos onde o plasma seminal demonstrou função anti inflamatória prevenindo a fagocitose e a ligação com os espermatozóides vivos, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos, a atividade do sistema complemento e desvencilhando os expermatozóides das extrusões de captura dos neutrófilos (Troedsson et al., 2000; Troedsson et al., 2001; Troesdsson et al., 2006; Alghamdi et al., 2004; Alghamdi & Foster, 2005) e com o passar do tempo a presença de neutrófilos visualizados por citologia exfoliativa diminui, mais rápido nas resistentes, mas também ocorre esse processo nas susceptíveis.

Os resultados citológicos mostram o mesmo perfil de resposta neutrofílica entre as éguas resistentes e susceptíveis quando foi realizada uma inseminação artificial, concordando com relatos anteriores onde também não foi constatada essa diferença (Liu et al., 1986; Williamson et al., 1987) ou com espermatozóides mortos conforme feito por Woodward et al. (2013), sendo que em ambos estudos as éguas susceptíveis apresentarem maior quantidade de neutrófilos em comparaçõa às reistentes.

Existem vários modos de interpretação das amostras citológicas coletadas do útero e métodos para sua coleta. No presente trabalho foi realizada a citologia exfoliativa e a classificação do processo inflamatório foi obtida pela relação entre células endometriais e neutrófilos conforme a classificação apresentada por Brook (1993). Kotilainen et al. (1994) relataram que em éguas resistentes não haviam neutrófilos presentes na citologia obtida pela técnica de lavado uterino com pequeno volume, mas outros autores relataram um baixo percentual de neutrófilos no mesmo tipo de animal (Card et al., 2004; Nikolakopoulos & Watson, 2000; Fioratti, 2010), indicando desacordos na competência da técnica. Exatamente por isso, Walter et al. (2012) desenvolveram um estudo e demonstraram que a citologia exfoliativa é o método diagnótico mais sensível e específico para o exame citológico do útero da égua. Dessa forma, no presente estudo, por citologia endometrial exfoliativa, foi constatada a presença de neutrófilos anteriormente a inseminação artificial tanto para as éguas

resistentes como para as susceptíveis. Porém, todas as éguas resistentes apresentaram citologia compatível com o aceitável para o estro enquanto apenas algumas das éguas susceptíveis apresentavam, nesse mesmo período, mais do que 5% de neutrófilos, indicando inflamação ativa, segundo Card (2005).

As éguas resistentes e as susceptíveis, mostram um pequeno aumento de neutrófilos no lúmen uterino após a ovulação e após a infusão de plasma seminal, sendo esta resposta totalmente diferente daquela apresentada após a inseminação artificial. Para éguas cobertas, o pico inflamatório após a cobertura é alcançado anteriormente a 24 horas, nesse período a citologia apresenta resultado semelhante a inflamação ativa, fato observado utilizando-se a técnica de lavado uterino com pequeno volume (Card et al., 2004) e por citologia exfoliativa (Fioratti, 2010), nesse experimento foi verificada alta porcentagem de neutrófilos 24 horas após a inseminação artificial com diminuição as 48 horas nas éguas resistentes e susceptíveis, sendo que as susceptíveis sempre tendem a manter maior número de neutrófilos no lúmen uterino por mais tempo. Porém, Woodward et al. (2013) verificaram que éguas susceptíveis tiveram um aumento no número de PMNs no tecido endometrial 2, 6, 12 e 24 horas após inseminação artificial e que para as éguas resistentes não houve diferença na infiltração neutrofílica, apenas uma tendência 2 e 6 horas após a cobertura com espermatozóides mortos. Além disso, apenas foi vista diferença entre as éguas susceptíveis e resistentes as 2 e 12 horas após a cobertura.

Éguas com evidência de inflamação na avaliação citológica e contaminação bacteriana apresentaram menores taxas de prenhez, apesar da pequena correlação entre esses testes. Ambas, citologia endometrial e cultura bacteriana são métodos diagnósticos utilizados para identificar as éguas com endometrite, pois as taxas de prenhez diminuem quanto maior a inflamação e a infecção (Riddle et al., 2007). Entretanto, a citologia endometrial identificou duas vezes mais éguas com endometrite do que a cultura bacteriana, fato similar ao observado por Digby & Ricketts (1982), que relataram que 91% das éguas com evidência clínica de endometrite persistente apresentaram citologia compatível, mas somente 45% das amostras foi positiva na cultura. Assim sendo, o presente trabalho focou com maior atenção os achados citológicos nos momentos avaliados, pois o perfil da resposta inflamatória traçado através da citologia endometrial exfoliativa foi semelhante para as éguas resistentes e susceptíveis a EPPC, uma vez que a relação neutrófilos/células endometriais apresentou semelhante redução ao longo do tempo para as duas classes de éguas. Porém, devemos deixar claro que o perfil parecido da resposta neutrofílica do útero entre as éguas susceptíveis e resistentes, também verificado por Woodward et al. (2013), não exclui o fato de que as éguas susceptíveis sempre apresentam essa resposta de forma exacerbada, dessa forma fica explícito que a resposta imune celular no útero, relacionada aos neutrófilos, é a mesma para ambos os grupos de éguas, mas que a solução desse processo que difere entre elas, sendo mais tardia para as éguas susceptíveis.

Nash et al. (2010b) verificaram que na citologia as 8, 16 e 24 hs após a IA com semen congelado ou com diluidor com gema de ovo os neutrófilos aumentam e somente após 24 hs que tem sua presença no lumen uterino dimiuida não importando o tipo de material inoculado no útero, mas na presença de espermatozóides essa migração é sempre em maior quantidade, mesmo perfil de resposta visualizado em nosso estudo comparando sêmen com plasma seminal e com ovulação controle.

Plasma seminal é considerado como modulador da inflamação. Os estudos in vivo relatam um papel pro-inflamatório do plasma seminal em comparação com diluidor de sêmen porque o plasma seminal estimulou o influxo de neutrófilos para o lúmen uterino (Portus et al., 2005). Por outro lado, ensaios in vitro demonstraram que o

plasma seminal tem função anti inflamatória prevenindo a fagocitose e a ligação com os espermatozóides vivos, inibindo a quimiotaxia dos neutrófilos, a atividade do sistema complemento e desatando os expermatozóides das extrusões de captura dos neutrófilos (Troedsson et al., 2000; Troedsson et al., 2001; Troesdsson et al., 2006; Alghamdi et al., 2004; Alghamdi & Foster, 2005). O cultivo de explantes não ajudou a explicar as características pro-ou anti-inflamatório contrastantes do plasma seminal observados pelo método in vitro ou em estudos in vivo. No modelo de explante, o equilíbrio dos efeitos pro e anti inflamatórias do plasma seminal podem favorecer as vias pró-inflamatórias porque uma circulação periférica não estava presente e por isso os efeitos anti-inflamatórios sobre neutrófilos e do complemento não estavam ativados. RNAm da IL-8 foi expresso pelo grupo controle e tratado 24 h após o desafio com o esperma, no entanto, a expressão não se alterou após o desafio (Nash et al., 2010a)

Discordando dessa informação, Palm et al. (2008) verificaram que além de provocar grande infiltração neutrofílica no endométrio, o plasma seminal ainda é responsável por aumentar a expressão das interleucinas pró-inflamatórias (IL-1β e IL-6). A duração dessa inflamação é mais curta quando o plasma seminal está presente na dose inseminante do que quando ele é removido ou substituído por diluente (Troedsson et al., 2002), nossos resultados demonstram que o plasma seminal foi incapaz de ser quimiotaxico aos neutrófilos. O número de PMNs encontrado no útero 24 horas após a IA foi significativamente menor quando o plasma seminal foi mantido na inseminação. Ao se realizar uma IA somente com plasma seminal foi detectada uma grande infiltração de PMNs no estrato compacto do endométrio, porém a limpeza uterina foi superior quando o plasma seminal estava presente (Troedsson et al., 2008).

Outra aparente função do plasma seminal seria proteger o espermatozóide de ser fagocitado pelos PMNs. Quando as éguas são cobertas pela segunda vez dentro de 24 horas, o sêmen da segunda IA é introduzido em um ambiente inflamado que se torna deletério a sua motilidade. Dados sugerem que o plasma seminal protege seletivamente os espermatozóides viáveis, mas não os mortos, de se ligarem e serem fagocitados pelo PMNs (Troedsson et al., 2000, Troedsson et al., 2005) e que algumas proteínas do plasma seminal são ativas na proteção e eliminação dos espermatozóides do útero por que favorecem a ligação dos neutrófilos aos espermatozóides em apoptose (Troedsson et al., 2006).

Observações sugerem que enquanto o sêmen de determinados garanhões provoca uma reação inflamatória exacerbada, o de outros é responsável por uma resposta inflamatória mais branda independente da égua ser ou não susceptível à EPPC (Troedsson et al., 2000, Troedsson et al., 2002).

4.2 Ultrassonografia uterina

As éguas susceptíveis e resistentes não apresentaram acúmulo de líquido no lúmen uterino durante o estro e antes de qualquer tipo de desafio ao útero, corroborando os achados de Bucca et al. (2008) que vislumbrou que um sub grupo de éguas susceptíveis realmente não apresenta essa característica. Entretanto, a ovulação e a mudança no status hormonal é capaz, assim como o desafio do útero com plasma seminal ou com sêmen fresco diluído, de provocar uma exsudação uterina em todas as éguas. Ainda, extendendo o exame até 48 hs após o desafio fica marcante a diferença na limpeza desse conteúdo, onde as éguas susceptíveis o mantêm e as resistentes praticamente eliminaram todo o líquido visível no lúmen uterino.

A limpeza uterina atrasada é de origem multifatorial sendo a reduzida atividade contrátil do miométrio o principal fator desencadeante (Troedsson & Liu, 1991). Diversos autores constataram diferença entre as éguas susceptíveis e resistentes quanto

a remoção mecânica do conteúdo uterino devido a variações contráteis do miométrio (Reitzenstein et al., 2002; Rigby et al., 2001; Nikolakopoulos et al., 2000b; Troedsson et al., 1993c). No presente estudo foi observado no exame ultrassonográfico que as éguas susceptíveis acumulam maior quantidade de líquido no interior do útero quando comparadas as éguas resistentes, as 24 e principalmente 48horas após a infusão com plasma seminal ou inseminação artificial.

O exame ultrassonográfico para avaliação da retenção de fluído uterino é uma ferramenta muito útil para o diagnóstico da endometrite podendo graduar essa inflamação baseada no volume e ecogenicidade (McKinnon et al., 1988). Porém, cuidados devem ser tomados na tentativa de quantificar o acúmulo do fluido uterino, pois a manipulação do trato reprodutivo pode alterar os resultados (Woodward & Troedsson, 2012; Fioratti, 2010). Entretanto, combinando o exame ultrassonográfico com a o citológico podemos ter uma via mais prática e acurada do estado do endométrio (Card, 2005).

Em conclusão, as éguas resitentes e susceptíveis exibem o mesmo acúmulo de líquido no lúmen uterino 24 horas independente se foi realizada infusão de plasma seminal, inseminação artificial com sêmen fresco diluído ou se o útero não foi desafiado e demonstraram maior capacidade de remoção do líquido intra uterino 48 horas o desafio. As éguas susceptíveis mostraram que a presença de espermatozóides no lúmen uterino induz um atraso na remoção de líquido ali presente. A citologia exfoliativa uterina das éguas resistentes e susceptíveis tem o mesmo perfil de resposta neutrofílica. As éguas susceptíveis apresentaram maior expressão de interleucinas pró inflamatórias, mas a expressão da anti inflamatória é semelhante ao das resistentes. Dessa forma, deve-se realizar um estudo para investigar uma fase mais precoce da resposta inflamatória uterina.

Tabela 1: Valores médios (mm) e porcentagem de redução (%) da altura da coluna de líquido acumulado na região da bifurcação uterina de éguas resistentes e susceptíveis a EPPC nos momentos 2 e 3.

	Resistentes		Redução	Susceptíveis		Redução
	M2	M3	%	M2	M3	%
T1	$10,5\pm1,9^{a}$	$0,9\pm0,4^{b}$	$91,1^{A}$	$14,4\pm10,7^{a}$	$10,2\pm6,0^{a}$	26^{B}
T2	$12,7\pm7,3^{a}$	$1,1\pm0,5^{b}$	$91,2^{A}$	$15,3\pm5,0^{a}$	$12,7\pm6,5^{a}$	17^{C}
T3	$13,5\pm3,5^{a}$	$0,9\pm0,4^{b}$	$93,5^{A}$	$18,1\pm5,0^{a}$	$18,5\pm6,9^{a}$	$-2,5^{D}$

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p<0.05$). ^{A,B,C,D} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M2, momento 2; M3, momento 3.

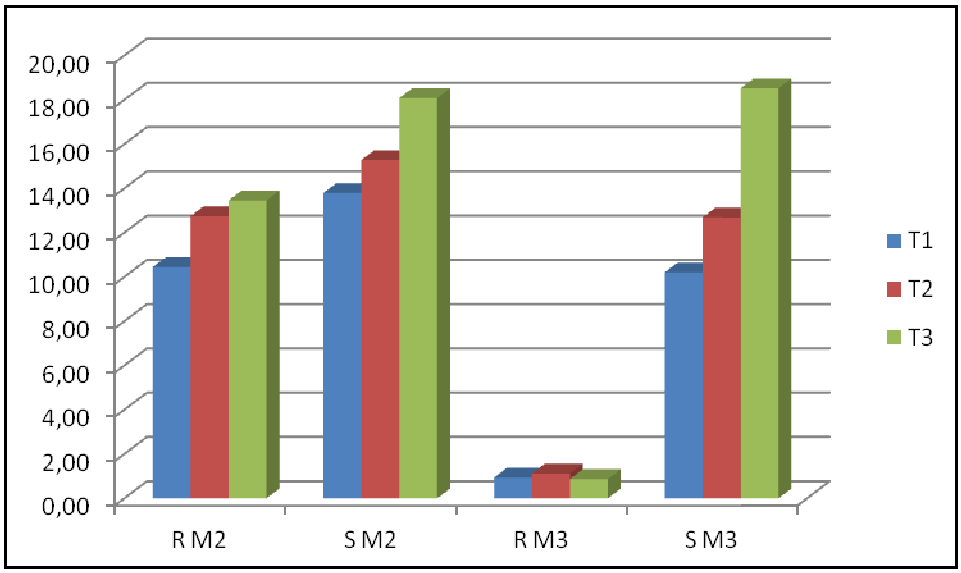


Figura 1: Média dos valores da coluna de fluído visualizado na área da bifurcação uterina (mm) nos momentos M2 e M3 em éguas resistentes e susceptíveis a EPPC. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. RM2, éguas resistentes no momento 2; SM2, éguas usceptíveis no momento 2; RM3, éguas resistentes no momento 3; SM3, éguas susceptíveis no momento 3. [a,b] Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p<0.05$).

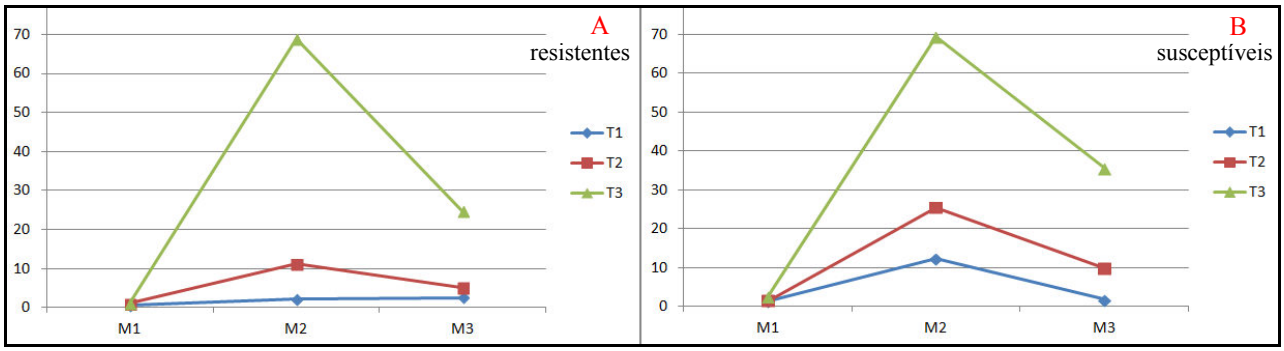


Figura 2: Porcentagem de neutrófilos observados em exame citológico ao longo do tempo analisado para as éguas resistentes e susceptíveis a EPPC. T1, ciclo controle; T2, ciclo com infusão uterina de plasma seminal; T3, ciclo onde foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco diluído. M1, momento 1; M2, momento 2; M3, momento 3.