

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA E RESPOSTA
INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS**

ERIKY AKIO DE OLIVEIRA TONGU

BOTUCATU- SÃO PAULO
SETEMBRO/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA E RESPOSTA
INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS**

ERIKY AKIO DE OLIVEIRA TONGU

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu,
para o curso de Mestrado em
Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio
Alvarenga

BOTUCATU- SÃO PAULO
SETEMBRO/2019

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

Tongu, Eriky Akio Oliveira.

Efeito da adição de meio condicionado por células tronco mesenquimais na viabilidade espermática e resposta inflamatória uterina pós inseminação artificial em equinos / Eriky Akio Oliveira Tongu. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Marco Antônio Alvarenga

Capes: 50504037

1. Equino - Inseminação artificial. 2. Endometrite.
3. Terapia celular. 4. Células-tronco. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Endometrite; Neutrófilo; Terapia celular; Útero.

Nome do autor (a): Eriky Akio de Oliveira Tongu

Título: EFEITO DA ADIÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA E RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Orientador

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

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro

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

Prof. Dr. Marcio Teoro, do Carmo

Membro

Central de Reprodução Animal LUBBREEDING – Cesário Lange/SP

Data da defesa: 09 de Setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e Nossa Senhora Aparecida, por terem guiado meu caminho para que sempre o melhor aconteça-se. As vezes em tempos difíceis tudo que precisamos é de fé!

A minha família minha mãe, meu pai e meus irmão que sempre me apoiaram em todos os momentos, sempre visando somente minha felicidade e meu crescimento. Que mesmo longe sempre permaneçamos unidos!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, que mesmo me conhecendo pouco me deu essa grande oportunidade de ingressar nessa excelente Universidade. Obrigado pela orientação, aprendizado, paciência, apoio e por acreditar no meu trabalho. Sempre serei grato ao senhor por tudo isso.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal FMVZ – UNESP Botucatu, em especial o Professor Frederico Ozanam Papa, que sempre estava disposto a ajudar e ensinar quem estivesse interessado, sua dedicação no departamento faz toda a diferença.

Ao Prof. Dr. André Crespilho e MSc. Dacio de Castro Dias que sempre serão meu eternos professores e orientadores! Obrigado pelas oportunidades, pelas broncas, pelos conselhos, pelas risadas, ensinamentos e principalmente por terem se tornado amigos tão próximos. Sei que sempre estarão torcendo por mim onde quer que eu esteja, devo muito do que sou como veterinário a vocês.

A todos os funcionários da FMVZ e de todos os Haras onde conduzi meu projeto, em especial Luciano Beretta e Dr. Marcio Teoro do Haras Lubbreeding e Dra. Renata do Haras Dharamsala, pelo apoio e boa vontade de ajudar!

A Dra. Marina Alvarenga e toda a equipe do laboratório OMICS Biotecnologia Animal, que nos forneceram o meio condicionado para realizar esse projeto, sempre muito solícita e me ajudando sempre!

A todos os meus amigos que sempre estiveram comigo em todos os momentos e sempre me deram força pra passar as dificuldades e seguir em frente, sem vocês eu não teria conseguido.

A todos os animais que eu tive contato até hoje, que sempre me ensinaram muito a como lidar com as diversas situações, além me sempre me fazerem mais feliz!

As fundações de fomento pela bolsa de estudo concedida para que esse trabalho pudesse ter sido realizado! Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo nº 2018/03045-9. Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

OBRIGADO A TODOS POR ESTAREM SEMPRE COMIGOO!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de PMN no lúmen uterino por citologia endometrial em éguas resistentes no grupos IA+MC e controle. Letras diferentes (a,b,c) indicam diferença estatística ($P<0,05$) entre os momentos dentro de um mesmo tratamento. * indica diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo momento.

Figura 2. Porcentagem de PMN no lúmen uterino por citologia endometrial em éguas susceptíveis nos grupos; IA+MC, PRÉ MC e controle. Letras diferente (a, b, c) indicam diferenças estatísticas ($P<0,05$) entre os tratamentos dentro de um mesmo momento. Houveram diferenças estatísticas entre todos os momentos para os 3 tratamentos.

Figura 3. Coluna de fluido uterino mensurado por ultrassonografia transretal (mm^2) antes e após 24 horas da IA em éguas susceptíveis. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ($P<0,05$) entre os tratamentos dentro de um mesmo momento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de cinética espermática realizada pela análise computadoriza CASA nos diferentes grupos e momentos.

ABREVIATURAS

AINES =. Anti-inflamatório não esteroide

COX = ciclooxigenase

CTMs = Célula tronco mesenquimal

EPMB = Extrato de parede de mycobacterias

EPPC = Endometrite persistente pós cobertura

IA = Inseminação Artificial

Ig = Imunoglobulina

IL = Interleucina

IL-1Ra = Antagonista do receptor de interleucina 1

iNOS =. Oxido nítrico sintase induzida

MC = Meio condicionado por células tronco

NETs = Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF- κ B = fator nuclear kappa-B

NO =. Oxido nitrico

PAMPs = Padrões moleculares associados a patógenos

PGE= Prostaglandina E2

PGF = Prostaglandina F2 α

PMN = Polimorfonucleares

PRP = Plasma rico em plaquetas

RRP = Receptores de reconhecimento de padrões

TGF- β = Fator de transformação de crescimento beta

TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	11
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Endometrite Persistente Pós Cobertura – EPPC	13
2.2. Mecanismos de defesa uterina	15
2.2.1. Barreiras Físicas	15
2.2.2. Imunidade Inata	15
2.2.3. Imunidade adaptativa	18
2.2.4. Contrações miométriais	18
2.3. Terapias aplicadas a EPPC	19
2.3.1. Lavagem uterina	19
2.3.2. Agentes ecbólicos	19
2.3.3. Anti-inflamatórios não-esteroides	20
2.3.4. Terapias imunomoduladoras	21
2.4. Células tronco mesenquimais e meio condicionado.	23
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2	42
ARTIGO	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL DE MÉTODOS	42
2.1. Desenho experimental	42
2.2. Obtenção do meio condicionado	43
2.3. Experimento 1	43
2.3.1. Seleção dos animais e colheita de sêmen	43
2.3.2. Manipulação do sêmen com meio condicionado	43
2.3.3. Teste de Termo Resistência (TTR)	43
2.3.4. Análise de cinética espermática	44

2.4. Experimento 2.....	44
2.4.2. Colheita de sêmen, preparo das doses e inseminação artificial	45
2.4.3. Grupo experimental	45
2.4.4. Coleta de amostras	45
2.4.4.1. Avaliações ultrassonográficas	45
2.4.4.2. Citologia uterina.....	46
2.4.4.3. Teste de fertilidade	46
2.5. Análise estatística	46
3. RESULTADOS.....	46
4. DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO:	50
REFERÊNCIAS.....	50

RESUMO

TONGU, E. A. O. EFEITO DA ADIÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA E RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS Botucatu – SP. 2019. 64p. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A endometrite persistente pós cobertura (EPPC) é uma das principais causas de infertilidade na égua devido uma inflamação exacerbada uterina pós cobertura/Inseminação Artificial (IA) diminuindo os índices de fertilidade. O uso do meio condicionado por células tronco mesenquimais demonstra grande efetividade na modulação inflamatória, podendo ser uma alternativa no tratamento e EPPC. O objetivo desse trabalho foi avaliar pela primeira vez diferentes concentrações de meio condicionado (MC) por células tronco mesenquimais equinas sobre a cinética espermática equina e capacidade imunomodulatória do MC na inflamação uterina pós IA em éguas resistentes e susceptíveis assim como sua fertilidade. Foram realizados 2 experimentos. No experimento 1 foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de MC sobre a cinética e integridade espermática equina. No Experimento 2 foi avaliado *in vivo* a capacidade moduladora do MC sobre o processo inflamatório endometrial de éguas resistentes e susceptíveis após inseminação artificial. O MC alterou o VCL ($P<0,05$) porém não alterou o restante dos parâmetros da cinética espermática ($P>0,05$). A integridade de membrana plasmática do sêmen equino não foi alterada ($P<0,05$). O MC reduziu a porcentagem de células polimorfonucleares (PMN) em éguas resistentes 6 horas após a inseminação artificial ($P<0,05$). Nas éguas susceptíveis o MC diminuiu as porcentagens de PMN e fluido intrauterino 6 e 24 horas após IA ($p<0,05$), com incremento na fertilidade; Controle 42,86%, IA-MC 57,14%, PRÉ-MC 85,71% ($P>0,05$). Conclui-se que o MC equino pode ser utilizado com segurança tanto antes como no momento da inseminação artificial juntamente com o sêmen. Além disso o MC possui efeito positivo na modulação da resposta inflamatória uterina pós IA, sendo o primeiro relato do seu uso para tratamento de EPPC.

Palavras-chave: neutrófilos, terapia celular, endometrite, útero

ABSTRACT

TONGU, E. A. O. Botucatu – SP. 2019. EFFECT OF ADDITION OF CONDITIONED MEDIUM OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON SPERMATIC FEASIBILITY AND UTERINE INFLAMMATORY RESPONSE POST BREDDING IN EQUINE

Botucatu – SP. 2019. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Persistent mating-induced endometritis (PMIE) is a major cause of subfertility in the mare due to exacerbated uterine inflammation post breeding, so therapies have been studied to immunomodulate the inflammatory response. The objective of this work was to evaluate different concentrations of conditioned medium (MC) by equine mesenchymal stem cells on equine sperm kinetics and MC immunomodulatory capacity in uterine inflammation after breeding in resistant and susceptible mares as well as their fertility. Two experiments were performed. In experiment 1 the effect of the addition of different MC concentrations on the equine sperm kinetics and integrity was evaluated. In Experiment 2, the modulatory capacity of MC on the endometrial inflammatory process of resistant and susceptible mares after artificial insemination was evaluated, as well as its effect on conception rates. The MC did not significantly alter sperm kinetics and plasma membrane integrity of equine semen. Even in resistant mares MC reduced the percentage of neutrophils 6 hours after artificial insemination ($p < 0.05$), not negatively interfering with fertility. In susceptible mares, MC decreased the percentages of neutrophils and intrauterine fluid 6 and 24 hours after AI ($p < 0.05$). It was concluded that equine MC does not negatively affect the quality of equine semen or its fertility, modulating the inflammatory response after coverage in resistant and susceptible mares.

Keywords: neutrophil, interleukins, persistent mating-induced endometritis.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças reprodutivas em éguas a endometrite se destaca como a principal causa de infertilidade em éguas, tendo uma prevalência estimada de 10-15% (1). Endometrite transitória fisiológica é normalmente observada após a inseminação artificial (IA) ou cobertura natural devido ao excesso de espermatozoides depositados no endométrio, causando estimulação antigênica ao sêmen, diluentes de sêmen e bactérias no lúmen uterino. Essa resposta inflamatória é necessária para manter um ambiente adequado para o recebimento do embrião, não devendo persistir por mais de 48 horas. Quando essa resposta persiste por período prolongado após a cobertura pode ser definir como um quadro de endometrite persistentes pós-cobertura (EPPC) (2).

Diante da etiologia e patogenia associada a EPPC, tratamentos voltados à diminuição da resposta inflamatória, como a utilização de anti-inflamatórios esteroidais, tem sido preconizados para a modulação da inflamação, na tentativa de otimização dos índices de concepção de fêmeas portadoras de EPPC (3–5). No entanto, como o uso exacerbado de anti-inflamatórios esteroides pode resultar em importantes efeitos adversos sistêmicos como laminite(6) e resistência à insulina (7).

Nos últimos anos observou-se o interesse crescente por terapias celulares empregando substâncias imunomoduladoras. Os imunomoduladores são substâncias que atuam de modo direto ou indireto nos mediadores inflamatórios, bloqueando ou atenuando a resposta inflamatória exacerbada e/ou persistente, promovendo o aumento nos índices de fertilidade (8–11).

Dentre as terapias imunomoduladoras utilizadas para o tratamento de EPPC destacam-se o uso de células tronco mesenquimais (CTMs) e o plasma rico em plaquetas (PRP), terapias que já demonstraram eficácia para a modulação da resposta inflamatória uterina em éguas (9,10,12,13).

O meio condicionado por células tronco (MC) corresponde uma nova possibilidade terapêutica para o tratamento de éguas com EPPC. O MC é obtido a partir da cultura de células-tronco mesenquimais, rico em fatores pré e pró-inflamatórios liberados durante o desenvolvimento celular. Além disso, o MC possui microvesículas com importante ação voltada à reparação tecidual e controle do estresse oxidativo, agindo diretamente na imunomodulação e

regeneração endometrial (14,15). Podendo ser uma boa possibilidade para o tratamento da EPPC.

Desta maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar pela primeira vez diferentes concentrações de MC equino sobre a cinética espermática, modulação da inflamação uterina pós-cobertura em éguas resistentes e susceptíveis a EPPC e suas taxas de concepção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Endometrite Persistente Pós Cobertura – EPPC

Em condições fisiológicas após a cobertura/IA poucos espermatozoides irão conseguir chegar até a tuba uterina. Esse processo de transporte de espermatozoides ocorre em torno de 4 horas(16,17). Concomitantemente, em resposta a estimulação antigênica os mecanismos de limpeza uterina são ativados utilizando: mecanismos de limpeza mecânica, resposta imune inata e adaptativa. Em éguas normais esse processo de limpeza uterina é debelado entre de 24-48 após a cobertura/IA sendo classificadas com resistentes (2,18,19).

Éguas que possuem falhas nos mecanismos de defesa uterina são classificadas como susceptíveis (20), sendo incompatível com um microambiente adequado para a sobrevivência embrionária (2,21).

A suscetibilidade à endometrite possui diversos fatores que propiciam a égua a ter uma limpeza uterina deficiente; como má conformação perineal, a qual tem sido associada com susceptibilidade, podendo estar associado com útero pendular, que se projeta abaixo da borda pélvica dificultando o sucesso na remoção do radiocolóide; idade avançada e/ou múltiparas associada a resposta imune alterada e/ou fibrose endometrial, contratibilidade miometrial deficiente, fibrose de cérvix e manipulação excessiva (1,22).

O grau de fibrose endometrial (23) é um fator importante para susceptibilidade, pois também influencia nas contrações miometriais e drenagem linfática (24). Infecções ou inflamações recorrentes ou crônicas como ocorrem em éguas susceptíveis contribuem para a patogênese da fibrose endometrial (25). Acredita-se que esse processo é mediado pela liberação dos armadilhas

extracelulares de neutrófilos (NETs), que são liberados pelos polimorfonucleares (PMN) (26), através de citocinas e enzimas pró-fibróticas e pela secreção de prostaglandinas(27). Além disso a inflamação persistente aumenta a produção PGF, podendo fazer com que possa ocorrer uma lise prematura do corpo lúteo e morte e reabsorção do embrião (28).

Deficiências na drenagem mecânica dos produtos inflamatórios possuem impacto sobre a susceptibilidade a endometrite (29,30). As contrações miométriais de éguas resistentes apresentam maior atividade mioelétrica, sendo mais prolongadas e intensas quando comparadas as susceptíveis, além disso ocorre uma disfunção no padrão de contração, iniciando no corpo do útero, não possuindo padrão rítmico e tendendo a ser no sentido oposto, levando o líquido para a ponta do corno uterino, dificultando ainda mais o processo de drenagem cervical e linfática (24,31).

Outro fator que pode contribuir para comprometer o mecanismo de contração miométrial é o excesso de sintetase induzível de óxido nítrico (iNOS) durante a inflamação (22). O óxido nítrico (NO) é um subproduto inflamatório com ação relaxante da musculatura lisa, que *in vitro* é capaz de neutralizar a resposta ao estímulo mioelétrico em altas concentrações (32). Em éguas susceptíveis a concentração de NO é aumentada nas secreções uterinas acumuladas no lúmen, assim como a expressão de mRNA de iNOS (30,33).

Os PMN encontrados no lúmen uterino não são população homogênea de células, por serem continuamente recrutados na circulação periférica durante os processos inflamatórios (34). Anteriormente, acreditava-se que os PMN de éguas susceptíveis possuíam deficiência na migração (34) diminuindo o reconhecimento de opsoninas (C3b e IgG) e fagocitose (35). Entretanto evidências mostram que as disfunções propostas então relacionadas ao ambiente uterino adverso e a não regulação da expressão gênica de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e metabólitos do ácido araquidônico (36–39).

Pesquisas vêm demonstrando uma forte relação entre o aumento da expressão de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias com a susceptibilidade a endometrite (4,40–43). O momento crítico envolvido na susceptibilidade está aparentemente relacionado ao pico da inflamação uterina ocorre 6h após o desafio antigênico (44). Estudos demonstram que nesse momento encontramos as maiores concentração de PMN e aumento de

expressão de citocinas tanto em éguas resistente como susceptíveis (10,44,45). Em éguas resistentes a expressão aumentada de citocinas anti-inflamatórias (IL-1ra, IL-10 e IL-6), e diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias, sugerem o início da resolução do processo inflamatório, enquanto éguas susceptíveis apresentam menor expressão das citocinas no mesmo momento, com uma maior expressão IL-1 e IL-8 (10,44,45).

Fumuso et al., (2007) demonstraram aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL8, TNF- α) e diminuição da expressão de IL-10 em éguas suscetíveis durante o estro em comparação com éguas resistentes. Éguas suscetíveis também demonstram uma resposta inflamatória prolongada à infusão bacteriana, com altos perfis de expressão gênica de IL-1 β , IL-8 e IL-1ra 24 - 72 horas após a inoculação de *E. coli* (45). Os mesmos autores também demonstraram que a relação entre IL-1ra e IL-1 β estava desequilibrada em éguas suscetíveis com endometrite infecciosa induzida, sugerindo uma resposta inflamatória descontrolada que foi correlacionada com o crescimento de patógenos uterinos.

2.2. Mecanismos de defesa uterina

2.2.1. Barreiras Físicas

A vulva é a barreira mais externa do trato reprodutor da égua, que juntamente com a prega do vestíbulo vaginal e a cérvix, funcionam como barreiras físicas contra a entrada de patógenos (2). Quando uma dessas barreiras falha, pode ocorrer pneumovagina, entrada de fezes e conseqüentemente patógenos. Isso ocorre principalmente durante o estro devido ao relaxamento da cervix, causando irritações vaginais e uterinas, predispondo esses animais a infecções uterinas(2,46).

2.2.2. Imunidade Inata

O principal estímulo antigênico para o início da resposta inflamatória, são os espermatozoides remanescentes após a cobertura/AI, sendo que a intensidade do estímulo é dependente da concentração espermática depositada

no útero (17,47,48). O reconhecimento antigênico é realizado pelas células presentes no endométrio, incluindo linfócitos, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos e células do estroma (42,49). A resposta a patógenos pelo sistema imune inato é baseado em receptores de reconhecimento de padrões (RRP) que detectam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (50). Sendo assim receptores *Toll-like* (TLRs) que são receptores transmembrana tipo I, possuem funções distintas no reconhecimento dos PAMPs, modificando a intensidade e o tipo da resposta imunológica frente ao agente (49). No endométrio de éguas, já foram descritos a expressão aumentada de TLR-2 e 4 pós-inoculação de *Escherichia coli* (50). Após a ativação dos TLRs a síntese do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) ativa os genes para a codificação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e da cicloxigenase-2 (COX-2) (51,52).

Após o reconhecimento ocorre a ativação de genes ligados ao processo inflamatório e expressão de mRNA que são traduzidos em citocinas e quimiocinas inicialmente pró-inflamatórias e posteriormente anti-inflamatórias que começam a atuar de forma autócrina e parácrina, e sistemicamente como função endócrina(49,53–55). As citocinas pró-inflamatórias, uma vez produzidas iniciam o processo em cascata dos eventos inflamatórios, existindo um delicado equilíbrio entre a expressão das citocinas pró e anti-inflamatórias, para que a resposta inflamatória seja adequada e que haja preservação do tecido (41,44).

As citocinas pró-inflamatórias liberadas são: interleucina(IL) -1, fator de necrose tumoral (TNF- α), IL 6 e IL-8. Rapidamente em resposta a estimulação quimiotática e antigênica, ocorre um influxo de polimorfonucleares (PMN) da circulação para o lúmen uterino sendo o pico de inflamação entre 4-6 horas pós cobertura/IA (29,44). As IL-1 α e β são liberadas no início do processo inflamatório por possuírem uma elevada função pró-inflamatória, levando a ativação e recrutamento de outras citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-6) e influxo leucocitário, principalmente de neutrófilos que contribuem para o aumento da sua expressão (56). O TNF- α possui propriedades pró-inflamatórias, produzindo aumento da permeabilidade vascular, aumento da produção de COX2, liberação de IL-8 e aumento de moléculas de adesão no endotélio vascular (selectinas e integrinas) para leucócitos (57). A IL-6 possui propriedades pró e anti-inflamatórias, durante a inflamação aguda a IL-6 aumenta a quimiotaxia de PMN, e posteriormente induz a apoptose dos PMN e

fagocitose por monócitos e macrófagos levando ao término da inflamação, além de modular outras citocinas inflamatórias (58). A IL-8 possui forte ação quimiotática, aumentando a expressão de moléculas de adesão na superfície celular das células endoteliais para auxiliar a aderência e diapedese dos PMN na parede dos vasos sanguíneos (56).

Os PMN, principalmente neutrófilos, desempenham um papel fundamental na imunidade inata, representando a primeira linha de defesa contra os contaminantes uterinos (59). Além das funções clássicas de fagocitose, liberação extracelular de peptídeos, enzimas líticas e antimicrobianos, os PMN tem a capacidade de liberar parte do próprio DNA, histonas, elastase, catepsina G e mieloperoxidase em resposta ao estímulo antigénico, formando NETs que impedem a disseminação desses organismos(60).

Pesquisas realizadas *in vitro* utilizando explantes uterinos de éguas demonstraram que os PMN liberados no útero possuem a capacidade de liberar NETs frente ao estímulo antigénico (61). Entretanto NETs podem ter efeitos deletérios em inflamações prolongadas sobre o útero, devido a liberação de mieloperoxidases, elastases, elevando a expressão do inibidor tecidual de metaloproteinases e diminuindo as concentrações de prostaglandina E₂ (PGE) que possui efeito anti-fibrótico (26,27).

A inflamação é modulada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias: IL-10, IL-4, IL-13 e antagonista do receptor de IL-1(IL-1ra) (4). A IL-1ra realiza uma regulação dos efeitos pró e anti-inflamatórios locais, competindo com a IL-1 pela ligação aos receptores IL-1 α e IL-1 β , diminuindo assim sua ação (49,53). A IL-10 é produzida por macrófagos, células dendríticas e vários subconjuntos de linfócitos T (CD4 + e CD8 +), agindo na inibição da expressão do complexo de histocompatibilidade da classe II e na produção de IL-1, IL-6, IL-12 e TNF e quimiocina IL-8 (62). O aumento da expressão de IL-10 é rápida (3h pós-IA), sendo observado regulação negativa da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias a partir das 12h após estimulação genica. Acredita-se que a resposta da IL-10 ocorre devido a intensidade da resposta inflamatória anterior, sendo o momento para a liberação de IL-10, e sua expressão são fatores importantes na resolução da inflamação (56,63).

2.2.3. Imunidade adaptativa

A inflamação uterina pós-cobertura é mediada predominantemente pela resposta imune inata, para que não haja resposta adaptativa aos espermatozoides, possibilitando que um mesmo macho consiga fecundar uma mesma fêmea diversas vezes(18). Entretanto, diversas classes de imunoglobulinas já foram descritas em secreções uterinas na égua, incluindo IgA, IgG, IgG(T) (16,64,65).

Imunoglobulinas juntamente com o sistema complemento C3b, são encontradas em maior concentração em éguas com culturas uterinas positivas do que em éguas que não apresentam infecção, sugerindo que o sistema imune adaptativo está relacionado com opsonização e apresentação de antígenos de patógenos que são depositados no útero no momento da cobertura (66–69). Porém os resultados das pesquisas são conflitantes sobre o aumento ou a diminuição dessas imunoglobulinas frente a estímulo antigénico pelos espermatozoides ou patógenos (29,64,66).

No endométrio da égua a população de linfócitos T, em sua maioria CD4+, CD8+ e células apresentadoras de antígenos classe II, se encontram em maior quantidade no extrato compacto em comparação ao extrato esponjoso, e aumentam em número em resposta ao sêmen ou a patógenos (70,71). Reforçando a ideia que há uma resposta imune adaptativa após estimulação antigênica. Entretanto, apesar do sistema imune adaptativo desempenhar um papel na endometrite fisiológica, pós-cobertura e contra patógenos, seus mecanismos de ação não estão bem elucidados, e aparentemente não apresentam envolvimento na susceptibilidade a EPPC (43,66,68).

2.2.4. Contrações miométriais

A intensidade da inflamação uterina influencia na liberação de prostaglandinas no endométrio, pelos macrófagos, PMNs e leucócitos que liberam prostaglandinas pela ação da lipooxigenase e ciclooxigenase provenientes do metabolismo do ácido araquidônico (42). Após sua liberação as prostaglandinas iniciam o processo de contrações miométriais. As miocontrações endometriais iniciam passados 30 minutos do contato dos

espermatozoides com o útero, a fim de transportar os espermatozoides até o local da fertilização e em aproximadamente quatro horas um número suficiente de espermatozoides já atingiu a tuba uterina (2,17,72). Rapidamente, o padrão de contração é alterado para a eliminação do restante dos contaminantes acontece por de pulsos contráteis que iniciam no corno uterino em direção a cérvix, para eliminar de forma mecânica(2,43) e por via linfática(24) os produtos inflamatórios do útero.

2.3. Terapias aplicadas a EPPC

2.3.1. Lavagem uterina

A lavagem uterina é um procedimento de rotina em éguas com EPPC, podendo ser realizada nos momentos pré e pós-inseminação, com objetivo de remover o exsudato inflamatório e debris celulares (21). A lavagem uterina pode ser realizada com solução fisiológica (NaCl 0,5%) ou com ringer lactato pós-IA (73).

Quanto mais precocemente é realizada a lavagem uterina, menor é o contato dos espermatozoides, patógenos, debris celulares e exsudatos inflamatórios com o endométrio, o que é benéfico para diminuição da inflamação em éguas susceptíveis (74). Normalmente o lavado uterino é realizado 4 horas após a IA, já que este é o tempo necessário para o transporte completo dos espermatozoides até a tuba uterina (17). Entretanto, Samper et al.,(2016) demonstrou que lavados uterinos uma hora pós IA na extremidade do corno uterino, pós-ovulação não alteram a fertilidade utilizando espermatozoides congelados.

2.3.2. Agentes ecbólicos

Alternativa a lavagem uterina, quando o fluído acumulado é menor que dois centímetros e hipocóico é o uso de fármacos ecbólicos como a ocitocina ou a PGF2 α (75–77). A ocitocina é o fármaco mais utilizada no tratamento de éguas susceptíveis, para auxiliar o *clearence* uterino (78), sendo as doses comumente

usadas de 10 - 20UI. Entretanto, estudos vem demonstrando que doses menores (2,5-5UI) conferem um melhor efeito na evacuação mecânica do útero quando comparado a maiores doses (79,80) .

A ocitocina estimula as contrações uterinas diretamente pela ligação de receptores específicos no endométrio e indiretamente pela liberação de ácido araquidônico e formação de prostaglandinas, que por sua vez aumentam as contrações miométriais pela despolarização da membrana aumentando o número de junções comunicantes (77,80).

Entretanto, a intensidade da resposta a administração da ocitocina, e sua depuração, depende do tempo decorrido entre a ovulação e o momento de aplicação, devido as variações na expressão dos receptores de oxitocina no miométrio, que são reguladas pelas concentrações de estrógeno e progesterona (78). Podendo ser utilizada por via parenteral após quatro horas da IA até 24 horas pós-IA com incremento na fertilidade em éguas susceptíveis (18,79). A carbetocina é um análogo sintético da ocitocina, que possui uma maior estabilidade a decomposição pelas aminopeptidase e oxidoreductase, conferindo um maior efeito sobre o miométrio e aparentemente sem variação da sua ação independente da fase do ciclo estral (78,81).

A utilização das prostaglandinas e seus análogos (cloprostenol) como agentes ecbólicos no período periovulatório é conflitante, devido a indução de uma possível sub luteólise precoce, encurtando assim as concentrações de progesterona e diminuindo o período interovulatório e consequentemente menores taxas de prenhes (82). O cloprostenol gera uma maior atividade mioelétrica comparada com a ocitocina, porém possui características semelhantes ao encontrado quando utilizado altas doses de ocitocina, com padrão de contração única e prolongada, o que não é benéfico para a limpeza uterina eficiente (82–84).

2.3.3. Anti-inflamatórios não-esteroides

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) vem sido testados no tratamento de EPPC como fenilbutazona (85), flunixin meglumine (79) e vedaprofeno (86). O ketoprofeno pode ser utilizado em jumentas, que possuem uma suscetibilidade semelhante a encontrada em éguas(87). A utilização de

fenilbutazona e flunixin meglumine em éguas e ketoprofeno em jumentas, diminuíram a porcentagem de PMN no extrato compacto 8 horas pós IA, porém isso resultou em um aumento de PMN no lúmen uterino no mesmo momento. (79,87). Demonstrando que os AINES atrasam a limpeza uterina, exacerbando a reação inflamatória, pois inibem a produção de COX-1 e COX-2 e consequentemente a produção de PGF2 α , que é responsável pela estimulação das contrações miométriais (73,80,84).

A utilização de vedaprofeno inibidor seletivo COX-2 na dose de 1mg/kg oral BIB, mais 20UI de ocitocina TID, começando um dia antes da IA até um dia pós ovulação, foi eficiente em éguas em susceptíveis, com diminuição na porcentagem de PMN e com incremento na fertilidade (86).

2.3.4. Terapias imunomoduladoras

A susceptibilidade a EPPC está relacionada a alteração na expressão de citocinas, com uma falhas na expressão de citocinas pro e anti-inflamatórias pós cobertura (39). Sendo assim estudos relacionados a terapias imunológicas e utilizando corticosteroides tem sido estudado com o objetivo restaurar o balanço imunológicos uterinos de éguas com EPPC e aumentando a fertilidade de éguas susceptíveis. Podendo-se destacar: extrato de parede celular de mycobacterias, suspensão com *Propionibacterium acnes*, glicorticoides (prednisolona/dexametasona), lactoferrina, plasma rico em plaquetas, soro autólogo condicionado e células tronco mesenquimais (3,9,10,88–92).

O extrato de parede de mycobacterias (EPMB), se mostrou eficaz na redução da expressão endometrial da IL-1b em éguas susceptíveis (58), assim como elevar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 no endométrio dessas éguas (40). Christoffersen et al.(4), utilizando EPMB, após inoculação em éguas susceptíveis com *E. coli* e observaram redução do acúmulo de fluído intrauterino, porém sem alteração na expressão das citocinas. Já Woodward et al.,(43) utilizou EPMB no momento da inseminação, e demonstrou uma diminuição na expressão da citocina IL-1b pelo endométrio. Além disso o tratamento com EPMB diminuiu as concentrações de NO em éguas susceptíveis (33).

Um produto semelhante denominado Eqstim® (Neogen Corp., Lexington, KY, EUA) que contem *Propionibacterium acnes* foi administrado em éguas com endometrite persistente, com consequente incremento na fertilidade (93).

Os anti-inflamatórios esteroidais vem sendo utilizados na reprodução equina com o intuito de melhorar as condições uterinas de éguas susceptíveis à EPPC. O acetato de prednisolona (0,1mg/kg) se mostrou eficaz na redução do acúmulo de líquido intrauterino, elevando os índices de fertilidade (65,89). Outro glicocorticoide com bons resultados descritos é a utilização de 50mg de dexametasona no momento da IA em éguas susceptíveis, mostrando-se segura e melhorando o ambiente uterino sem alterar os mecanismos de defesa uterina (3). Esse fármaco ainda pode ser utilizado juntamente ao diluente de sêmen, sem prejuízos à qualidade seminal e auxiliando na redução dos sinais de endometrite pós-cobertura (5). A dexametasona na dose de ainda promove a redução da expressão de interleucinas pró-inflamatórias, como as IL-1 β , IL-6 e IL-8 e aumento das interleucinas anti-inflamatória IL-10 e IL-1Ra (45,88). O efeito do glicocorticoides na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias ocorre através de diferentes mecanismos pela ligação dos receptores de glicocorticoides no citoplasma e no núcleo celular. Esses receptores são responsáveis por ativar a transcrição ou inibir a transcrição dessas citocinas, aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias e diminuindo a expressão das pró-inflamatórias (94).

A lactoferrina é uma glicoproteína com alta afinidade com moléculas de ferro e lipopolissacarídeos de bactérias gram negativas, tendo ação bactericida, bacteriostática (95). Além disso a lactoferrina possui funções imunomodulatórias, ativação do sistema imune e controle de mielopoiese (95–98). Sendo expressa no epitélio glandular, luminal e em grânulos de PMN. Apresentando diferenças na transcrição de acordo com a fase do ciclo estral, sendo maior durante o estro e durante os processos inflamatórios uterinos (99). A utilização de lactoferrina junto ao sêmen reduziu a expressão endometrial de interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-8 em éguas, porém não foi capaz de reduzir o fluido intrauterino nem porcentagem de células de defesa 24h pós IA em éguas(92).

O PRP é outra terapia imunomodulatória que já demonstrou ser eficiente no útero de éguas susceptíveis a endometrite, reduzindo o acúmulo de fluido intrauterino e do influxo de PMNs para o lúmen uterino (13). O PRP atua na

inflamação através dos fatores de crescimento de liberação que são armazenados nos grânulos- α das plaquetas (100). Alguns fatores de crescimento liberados pelas plaquetas após ativação no tecido inflamado são importantes na reparação tecidual devido aos seus efeitos mitogênicos, antiinflamatórios, quimiotáticos e neovasculares (101,102).

O PRP é eficaz para reduzir a infiltração de PMNs no lúmen uterino e no estrato compactado, além de reduzir a expressão de COX-2 das éguas suscetíveis após a inseminação artificial, tendo melhores resultados no tratamento pré inseminação do que pós-IA (9). O PRP também reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) e da iNOS (91), se mostrando muito benéfico no incremento da fertilidade em éguas problema (9,91).

2.4. Células tronco mesenquimais e meio condicionado.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido utilizada em medicina humana e veterinária para modular a resposta inflamatória em processos inflamatórios agudos e crônicos (103,104). A injeção de CTMs no endométrio de éguas já foi descrita como uma possível alternativa para o tratamento de fibrose endometrial(105), e promovem um aumento da expressão da IL-Ra pelo endométrio de éguas resistentes, com resultados mais interessantes quando comparado com a utilização de soro autólogo condicionado (10). Uma pesquisa utilizando CTMs autóloga oriunda de biopsias endometriais de éguas e após 2 semanas infundidas em diestro, demonstrou propriedades imunomoduladoras e ação no lúmen uterino por até 24 horas após a infusão, não penetrando no endométrio saudável (106).

O MC é obtido a partir da cultura de células-tronco mesenquimais (MSCs), rico em fatores pré e pró inflamatórios liberados durante o desenvolvimento celular (107–109). As MSCs possuem uma ampla capacidade de imunorregulação, capazes de influenciar respostas imunes tanto adaptativas como inatas e sendo considerados hipoinmunogênico. As MSCs suprimem a atividade de uma ampla gama de células imunes, incluindo células T, células T natural killer, células dendríticas, células B, neutrófilos, monócitos, macrófagos. As citocinas anti-inflamatórias que são secretadas pelas células-tronco presentes no MC são: Fator de transformação do crescimento beta e algumas

interleucinas (IL), ou seja, a IL-6, IL-10, IL-27, IL-17 e, IL-13, IL-12 e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) enquanto as citocinas pró-inflamatórias secretadas são IL-8 / CXCL- 8 , IL-9 e IL-1 (110).

Um estudo onde se utilizou MC para o tratamento de doenças musculares associadas a inflamação crônica e liberação de citocinas pro-inflamatórias associado a obesidade em humanos, mostrou efeito benéfico melhorando a ativação de fibroblastos e diminuíram a inflamação através do bloqueio da atividade de IL-1 usando o mediador imunomodulador, IL-1ra. Sugerindo que o CM pode ser uma terapia promissora para combater a inflamação associada à inatividade muscular (111). Além disso, o MC possui microvesículas com importante ação voltada à reparação tecidual e controle do stress oxidativo, agindo diretamente na imunomodulação e regeneração endometrial (14,15). Um estudo realizado em ratos com doença pulmonar obstrutiva, demonstrou capacidade regulação na citocinas inflamatórias, redução na transcrição de mRNA de moléculas adesão intercelular e vascular, consequentemente ocorre diminuição no recrutamento de células inflamatórias (12).

Lange-Consiglio *et al.*, (2013) utilizando MC para o tratamento de cavalos com diferentes graus de lesões ligamentares e tendíneas foi observada a eficácia na recuperação tecidual e diminuição da inflamação tissular pós-tratamento. Al-sharabi *et al.*, (2016), avaliaram o efeito do MC em relação a secreção de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias na polpa dental de ratos saudáveis, analisando os efeitos regenerativos *in vitro* e *in vivo* do tratamento. Nesse estudo as células T cultivadas em MC apresentaram maior produção de interleucina (IL) IL-8, IL-10 e IL-6, além de prostaglandina E2 (PGE2). Já *in vivo* o tratamento demonstrou pronunciado efeito regenerativo e anti-inflamatório.

Além do seu potencial regenerativo e imunomodulador, o MC tem se mostrado eficaz como adjuvante na criopreservação de células tronco mesenquimais retiradas de cordão umbilical de potros, garantindo a manutenção das características biológicas originais (expressas por células frescas) mesmo após a descongelação. Acredita-se que o MC atue através de mecanismo de proteção que modulam o stress oxidativo celular, diminuindo as lesões de membrana e garantindo maior viabilidade celular (14).

HAO *et al.*, (2014) mostraram que o MC derivado do tecido adiposo utilizado no tratamento de lesão neuronal produz efeito positivo no tecido alvo de

maneira dependente da concentração, obtendo um melhor efeito protetor utilizando a concentrações de 50% a 70% de MC. Além disso, afirmam que menos de 50% MC, os efeitos protetores foram menos evidentes, e 100% MC não foi observado um menor efeito protetor.

Em um experimento realizado com a utilização de MSC de medula ossea de doadores humanos, assim como seu MC, em feridas induzidas em útero de ratas, demonstrou há possibilidade da utilização de MC heterologo, além de que não houve diferença estatística entre a utilização de MSC e de MC na reparação tecidual uterina de ratas (114).

CORRADETTI et al., (117) demonstraram em um estudo *in vitro* a possibilidade de aplicação de células tronco mesenquimais de membranas amnióticas e o seu MC no tratamento de doenças uterinas em equinos. Demonstrando melhoria na capacidade imunomodulatória, regenerativa e proliferativa do endométrio, podendo diminuir perdas gestacionais causadas pela fibrose endometrial. Reforçando a ideia de que as MSCs obtidos dos tecidos gestacionais exercem efeitos benéficos na regeneração tecidual através da liberação de fatores solúveis e indicam os MC como novas possibilidades terapêuticas livres de células para aplicações em medicina regenerativa em equinos (115).

O MC agrega benefícios quando comparado à utilização de células-tronco, já que por não ser uma suspensão celular podem ser fabricadas, liofilizadas, embaladas e transportadas mais facilmente, não havendo necessidade de se conduzir testes de compatibilidade com um possível receptor, evitando-se possíveis rejeições (107,110,116). Portanto, o MC tem uma perspectiva promissora de ser produzido como fármacos para a medicina regenerativa e imunomodulatória(117). Dessa forma, o MC representa uma promissora e inovadora opção para utilização em reprodução equina, sendo de fácil manipulação e armazenamento, o que facilita a implementação em situações de campo (107,110,115,118).

REFERÊNCIAS

1. Woodward EM, Troedsson MH. Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. J Equine Vet Sci [Internet]. 2013;33(9):673–82. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.11.010>
2. Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 1999;52(3):461–71.
 3. Bucca S, Carli A, Buckley T, Dolci G, Fogarty U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*. 2008;70(7):1093–100.
 4. Christoffersen M, Woodward E, Bojesen AM, Jacobsen S, Petersen MR, Troedsson MHT, et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Vet Res* [Internet]. 2012;8(1):41. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/41>
 5. Fioratti EG, Villaverde AISB, Melo CM, Tsunemi MH, Papa FO, Alvarenga MA. Influence of Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Viability and Fertility of Equine Semen. *J Equine Vet Sci*. 2012;32(12):771–5.
 6. Johnson PJ, Slight SH, Ganjam VK, Kreeger JM. Glucocorticoids and laminitis in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2019 Mar 11];18(2):219–36. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749073902000159?via%253Dihub>
 7. Tiley HA, Geor RJ, McCutcheon LJ. Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. *Am J Vet Res*. 2007;68(7):753–9.
 8. Scoggin CF. Endometritis. *Vet Clin North Am Equine Pract* [Internet]. 2016;32(3):499–511. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749073916300414>
 9. Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho AM, Dell'Aqua JA, Miró J, et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology* [Internet]. 2017;104:120–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.007>
 10. Ferris RA, Frisbie DD, McCue PM. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to

- spermatozoa in mares. *Theriogenology* [Internet]. 2014;82(1):36–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.015>
11. Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2007 Jul 15 [cited 2019 Mar 10];118(1–2):30–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242707001304>
 12. Ahmadi M, Rahbarghazi R, Aslani MR, Shahbazfar A-A, Kazemi M, Keyhanmanesh R. Bone marrow mesenchymal stem cells and their conditioned media could potentially ameliorate ovalbumin-induced asthmatic changes. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;85:28–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332216315517>
 13. Reghini FM, Ramires C, Segabinazzi LG, Manoela M, Chaves BC, Paula C De, et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology* [Internet]. 2016;86(2):516–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>
 14. Maia L, Dias MC, Moraes CN De, Aqua CDPF, Silveira LSL. Conditioned medium : a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. 2017;41:239–48.
 15. Shen C, Lie P, Miao T, Yu M, Lu Q, Feng T, et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):20–30.
 16. Troedsson MHT. Breeding-Induced Endometritis in Mares. *Vet Clin North Am - Equine Pract*. 2006;22(3):705–12.
 17. Fiala SM, Pimentel CA, Mattos ALG, Gregory RM, Mattos RC. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*. 2007;67(3):556–62.
 18. Troedsson MHT. Problems After Breeding. *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2008;28(11):635–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.011>
 19. LeBlanc MM. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology*. 2008;70(3):421–9.

20. Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG. Interaction between equine semen and the endometrium : the inflammatory response to semen. 2001;68:273–8.
21. Watson ED. Post-breeding endometritis in the mare. *Anim Reprod Sci*. 2000;60–61:221–32.
22. Troedsson MHT, Woodward EM. Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. *Reprod Biol* [Internet]. 2016;16(1):8–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2016.01.003>
23. Kenney R, Doig P. Equine endometrial biopsy. In: *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 1986. p. 723–9.
24. Leblanc MM, Johnson R, Maron B, Calderwood Mays M, Valderrama C. Lymphatic Clearance of India Ink in Reproductively Normal Mares and Mares Susceptible to Endometritis [Internet]. Vol. 1, *BIOL REPROD MONO*. 1995 [cited 2019 Mar 11]. Available from: https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/52/monograph_series1/501/5050298
25. Skarzynski D, Rebordão M, Mateus L, Galvão A, Ferreira-Dias G, Szóstek A, et al. Physiopathologic Mechanisms Involved in Mare Endometrosis. *Reprod Domest Anim*. 2014;49:82–7.
26. Rebordão MR, Amaral A, Lukasik K, Szóstek-Mioduchowska A, Pinto-Bravo P, Galvão A, et al. Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 Mar 10];113:8–18. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X18300438>
27. Pinto-Bravo P, Amaral A, Szóstek-Mioduchowska A, Ferreira-Dias G, Galvão A, Rebordão MR, et al. Impairment of the antifibrotic prostaglandin E2 pathway may influence neutrophil extracellular traps–induced fibrosis in the mare endometrium. *Domest Anim Endocrinol* [Internet]. 2018;67:1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.10.004>
28. Nagy A, Dyson SJ, Murray JK. A veterinary review of endurance riding as an international competitive sport. *Vet J* [Internet]. 2012 Dec [cited 2016 Sep 1];194(3):288–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819800>

29. Christoffersen M, Troedsson MHT. Inflammation and fertility in the mare. *Reprod Domest Anim*. 2017;52:14–20.
30. Alghamdi AS, Foster DN, Carlson CS, Troedsson MHT. 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*. 2005;53(5):230–7.
31. Rigby SL, Barhoumi R, Burghardt RC, Collieran P, Thompson JA, Varner DD, et al. Mares with Delayed Uterine Clearance Have an Intrinsic Defect in Myometrial Function¹. *Biol Reprod* [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2019 Mar 11];65(3):740–7. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod65.3.740>
32. Khan FA, Chenier TS, Murrant CL, Foster RA, Hewson J, Scholtz EL. Dose-dependent inhibition of uterine contractility by nitric oxide: A potential mechanism underlying persistent breeding-induced endometritis in the mare. *Theriogenology* [Internet]. 2017;90:59–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.026>
33. Woodward E, Christoffersen M, Campos J, Horohov D, Scoggin K, Squires E, et al. An investigation of uterine nitric oxide production in mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis and the effects of immunomodulation. *Reprod Domest Anim*. 2013;48(4):554–61.
34. Liu IKM, Cheung ATW, Walsh EM, Ayin S. The Functional Competence of Uterine-Derived Polymorphonuclear Neutrophils (PMN) from Mares Resistant and Susceptible to Chronic Uterine Infection: A Sequential Migration Analysis¹. *Biol Reprod* [Internet]. 1986 Dec 1 [cited 2019 Mar 11];35(5):1168–74. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod35.5.1168>
35. Troedsson MHT, Liu IKM, Thurmond M. Function of Uterine and Blood-Derived Polymorphonuclear Neutrophils in Mares Susceptible and Resistant to Chronic Uterine Infection: Phagocytosis and Chemotaxis¹. *Biol Reprod* [Internet]. 1993 Sep 1 [cited 2019 Mar 11];49(3):507–14. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod49.3.507>

- lookup/doi/10.1095/biolreprod49.3.507
36. Katila T. Uterine defence mechanisms in the mare. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 1996 Apr 1 [cited 2019 Mar 11];42(1–4):197–204. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432096015072>
 37. Asbury AC, Schultz KT, Klesius PH, Foster GW, Washburn SM. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. *J Reprod Fertil Suppl* [Internet]. 1982 [cited 2019 Mar 11];32:151–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6962849>
 38. Asbury AC, Hansen PJ. Effects of susceptibility of mares to endometritis and stage of cycle on phagocytic activity of uterine-derived neutrophils. *J Reprod Fertil Suppl* [Internet]. 1987 [cited 2019 Mar 11];35:311–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3479586>
 39. Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D, Scoggin KE, et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction*. 2013;145(3):289–96.
 40. Fumuso EA, Rivulgo M, Aguilar J, Gigue S, Rogan D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;118:30–9.
 41. Zayed MN, Schumacher J, Misk N, Dhar MS. Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid. *Vet J* [Internet]. 2016;217:26–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023316300685>
 42. Nash DM, Sheldon IM, Herath S, Lane EA. Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2019 Mar 10];119(1–2):31–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432009002814?via%253Dihub>
 43. Katila T. What do we know about susceptibility of mares to endometritis? *Pferdeheilkd Equine Med*. 2016;24(1):61–5.
 44. Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D, Scoggin KE, Squires EL, et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune

- response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *REPRODUCTION* [Internet]. 2013 Mar [cited 2019 Mar 9];145(3):289–96. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/145/3/289.xml>
45. Christoffersen M, Woodward EM, Bojesen AM, Petersen MR, Squires EL, Lehn-Jensen H, et al. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology* [Internet]. 2012;78(5):991–1004. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.016>
 46. Dascanio JJCSWBL. Equine fungal endometritis. *Equine Vet Educ*. 2001;13:324–9.
 47. Dell’aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2001;68(2001):344–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03784320/68/3-4>
 48. Gomes GM, Crespilho AM, Leão KM, Jacob JCF, Gomes LPM, Segabinazzi LG, et al. Can Sperm Selection, Inseminating Dose, and Artificial Insemination Technique Influence Endometrial Inflammatory Response in Mares? *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2019;73:43–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.09.010>
 49. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2010;11(5):373–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1863>
 50. Marth CD, Young ND, Glenton LY, Noden DM, Browning GF, Krekeler N. Deep sequencing of the uterine immune response to bacteria during the equine oestrous cycle. *BMC Genomics* [Internet]. 2015;16(1):1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2139-3>
 51. Girling JE, Hedger MP. Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: Emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(6):481–9.
 52. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Filì L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-Like Receptors 3 and 4 Are Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Can Inhibit Their T-Cell Modulatory Activity

- by Impairing Notch Signaling. *Stem Cells* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2019 Mar 10];26(1):279–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0454>
53. Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*. 2016;2(4):d12-26.
 54. Cuneo AA, Autieri M V. Expression and function of anti-inflammatory interleukins: the other side of the vascular response to injury. *Curr Vasc Pharmacol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2019 Mar 3];7(3):267–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601851>
 55. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* [Internet]. 1997 Jan 1 [cited 2019 Mar 10];2:d12-26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9159205>
 56. Mette C, Camilla Dooleweerd B, Stine J, Anders Miki B, Morten Roenn P, Henrik LJ. 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* [Internet]. 2010 Nov 15 [cited 2019 Mar 10];138(1–2):95–105. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242710002485?via%253Dihub>
 57. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol J Pathol* [Internet]. 2008 [cited 2019 Mar 10];214:149–60. Available from: www.interscience.wiley.com
 58. Fumuso E, Rogan D, Gigue S, Videla-dorna I. Endometrial IL-1 b , IL-6 and TNF- a , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis Effects of estrous cycle , artificial insemination and immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003;96:31–41.
 59. Nash DM, Paddison J, Davies Morel MCG, Barnea ER. Preimplantation factor modulates acute inflammatory responses of equine endometrium. *Vet Med Sci* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2019 Mar 10];4(4):351–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/vms3.126>
 60. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012;198(5):773–83.
 61. Rebordão MR, Carneiro C, Alexandre-Pires G, Brito P, Pereira C, Nunes

- T, et al. Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2019 Mar 10];106:41–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037814000680?via%253Dihub>
62. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* [Internet]. 2008 Dec [cited 2019 Mar 11];226(1):205–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161426>
 63. Couper KN, Blount DG, Riley EM. Infection IL-10: The Master Regulator of Immunity to infection. *J Immunol Ref* [Internet]. 2008 [cited 2019 Mar 11];180:5771–7. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/180/9/5771><http://www.jimmunol.org/content/180/9/5771.full#ref-list-1>
 64. Woodward EM, Troedsson MHT. Inflammatory mechanisms of endometritis. *Equine Vet J*. 2015;47(4):384–9.
 65. Dell'Aqua JA, Papa FO, Lopes MD, Alvarenga MA. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2006 Aug [cited 2019 Mar 10];94(1–4):270–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432006001382>
 66. Troedsson MHT, Liu IKM, Thurmond M. Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus Zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection¹. *Biol Reprod* [Internet]. 1993 Sep 1 [cited 2019 Mar 10];49(3):502–6. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod49.3.502>
 67. Asbury AC, Halliwell REW, Foster GW, Longino SJ. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology* [Internet]. 1980 Oct 1 [cited 2019 Mar 10];14(4):299–308. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X80900795>
 68. Watson ED, Stokes CR, Bourne FJ. Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis.

- Vet Immunol Immunopathol [Internet]. 1987 Sep [cited 2019 Mar 10];16(1–2):107–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3314110>
69. Brown AE, Hansen PJ, Asbury AC. Opsonization of bacteria by uterine secretions of cyclic mares. Am J Reprod Immunol Microbiol [Internet]. 1985 Dec [cited 2019 Mar 10];9(4):119–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4091170>
 70. Tunón A-M, Katila T, Magnusson U, Nummijärvi A, Rodriguez-Martinez H. T-cell distribution in two different segments of the equine endometrium 6 and 48 hours after insemination. Theriogenology [Internet]. 2000 Oct 1 [cited 2019 Mar 10];54(6):835–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11097038>
 71. Watson ED, Thomson SR. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. Equine Vet J [Internet]. 1996 Mar [cited 2019 Mar 10];28(2):106–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706640>
 72. Samper JC, Stanford MS, French HM, Chapwanya A. Post-breeding inflammation in mares after insemination with large and low doses of fresh or frozen semen. Pferdeheilkd Equine Med. 2016;32(1):24–6.
 73. Katila T. Update on endometritis therapy. Pferdeheilkd Equine Med. 2016;32(1):39–45.
 74. Canisso IF, Stewart J, Coutinho da Silva MA. Endometritis. Vet Clin North Am Equine Pract [Internet]. 2016;32(3):465–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749073916300438>
 75. Alvarenga MA, Coutinho da Silva MA. Fungal Endometritis. In: McKinnon AO, Squires EL, Varner DD, editors. Equine Reproduction. Second edi. Wiley; 2011. p. 2821–9.
 76. Veronesi MC, Carluccio A, Kindahl H, Faustini M, Battocchio M, Cairoli F. Oxytocin-induced PGF2 α release in mares with and without post-breeding delayed uterine clearance. J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med. 2006;53(5):259–62.
 77. Cadario ME, Thatcher M-JD, LeBlanc MM. Relationship between Prostaglandin and Uterine Clearance of Radiocolloid in the Mare¹. Biol Reprod [Internet]. 1995 Jan 1 [cited 2019 Mar 9];52(monograph_series1):495–500. Available from:

- https://academic.oup.com/biolreprod/article/52/monograph_series1/495/5050283
78. Steckler D, Naidoo V, Gerber D, Kähn W. Ex vivo influence of carbetocin on equine myometrial muscles and comparison with oxytocin. *Theriogenology* [Internet]. 2012;78(3):502–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.030>
 79. Risco AM, Reilas T, Muilu L, Kareskoski M, Katila T. Effect of oxytocin and flunixin meglumine on uterine response to insemination in mares. *Theriogenology* [Internet]. 2009 Dec [cited 2019 Mar 9];72(9):1195–201. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X09003574>
 80. Gutjahr S, Paccamont DL, Pycock JF, Taverne MAM, Dieleman SJ, Van Der Weijden GC. Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mare. *Theriogenology*. 2000;54(00):3.
 81. Schramme AR, Pinto CRF, Davis J, Whisnant CS, Whitacre MD. Pharmacokinetics of carbetocin, a long-acting oxytocin analogue, following intravenous administration in horses. *Equine Vet J*. 2008;40(7):658–61.
 82. Nie GJ, Johnson KE, Wenzel JGW, Braden TD. Luteal function in mares following administration of oxytocin, cloprostenol or saline on Day 0, 1 or 2 post-ovulation. *Theriogenology*. 2003;60(6):1119–25.
 83. Combs GB, LeBlanc MM, Neuwirth L, Tran TQ. Effects of prostaglandin F(2 α), cloprostenol and fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Theriogenology*. 1996;45(8):1449–55.
 84. Troedsson MHT, Liu IKM, Ing M, Pascoe J. Smooth Muscle Electrical Activity in the Oviduct, and the Effect of Oxytocin, Prostaglandin F2 α , and Prostaglandin E2 on the Myometrium and the Oviduct of the Cycling Mare1. *Biol Reprod* [Internet]. 1995 Jan 1 [cited 2019 Mar 9];52(monograph_series1):475–88. Available from: https://academic.oup.com/biolreprod/article/52/monograph_series1/475/5050346
 85. LeBlanc MM. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. *Pferdeheilkd Equine Med*. 1997;13(5):483–5.
 86. Rojer H, Aurich C. Treatment of Persistent Mating-Induced Endometritis in

- Mares with the Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug Vedaprofen. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2010 Dec [cited 2019 Mar 9];45(6):e458–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2009.01572.x>
87. Vilés K, Rabanal R, Rodríguez-Prado M, Miró J. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. *Theriogenology* [Internet]. 2013;79(7):1019–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.006>
 88. Woodward EM, Christoffersen M, Horohov D, Squires EL, Troedsson MHT. The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. *Equine Vet J*. 2015;47(2):235–9.
 89. Papa FO, Dell'Aqua JA, Alvarenga MA, Melo CM, Zahn FS. Use of corticosteroid therapy on the modulation of uterine inflammatory response in mare after artificial insemination with frozen semen. *Pferdeheilkunde*. 2008;24(January):79–82.
 90. Barbacini S, Zavaglia G, Gulden P, Marchi V, Necchi D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. *Equine Vet Educ* [Internet]. 2010 Jan 5 [cited 2018 Jun 23];12(6):312–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-3292.2000.tb00067.x>
 91. Metcalf ES. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2014;34(1):128. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080613007211>
 92. Coutinho da Silva MA, Darr CR, Moraes LE, Forshey BS. Lactoferrin Modulates Uterine Inflammation Postbreeding in the Mare. *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2017;56:63–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.007>
 93. Rohrbach B, Sheerin P, Steiner J, Matthews P. Use of *Propionibacterium acnes* as adjunct therapy in treatment of persistent endometritis in the broodmare. *Anim Reprod Sci*. 2006;94(1–4):259–60.
 94. Löwenberg M, Stahn C, Hommes DW, Buttgereit F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids*. 2008;73(9–10):1025–9.

95. Suzuki YA, Lopez V, Lönnerdal B. Lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2005 Nov 2 [cited 2019 Mar 10];62(22):2560–75. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5371-1>
96. Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* [Internet]. 1992 May 22 [cited 2019 Mar 10];1121(1–2):130–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016748389290346F>
97. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2005 Nov 2 [cited 2019 Mar 10];62(22):2549–59. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5370-2>
98. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol*. 2002;80(1):1–6.
99. Kolm G, Klein D, Knapp E, Watanabe K, Walter I. Lactoferrin expression in the horse endometrium: Relevance in persisting mating-induced endometritis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;114(1–2):159–67.
100. Textor JA, Norris JW, Tablin F. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *Am J Vet Res* [Internet]. 2011 Feb [cited 2019 Mar 11];72(2):271–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281204>
101. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Intravia J, Beitzel K, Apostolakos J, Cote MP, et al. An In Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Effects of Platelet-Rich Plasma, Ketorolac, and Methylprednisolone. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* [Internet]. 2013 Apr [cited 2019 Mar 11];29(4):675–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395471>
102. Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* [Internet]. 2002 Dec [cited 2019 Mar 11];22(6):547–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516826>
103. Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AAM, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2019 Mar 10];6(3):206–14. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187350611100002X?via%253Dihub>
104. Barrachina L, Remacha A, Romero A, Vázquez F, Albareda J, Prades M, et al. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 10];171:57–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.007>
 105. Alvarenga MA, Carmo MT, Segabinazzi LG, Guastali MD, Maia L, Landim-Alvarenga FC. Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares. *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2016;42:12–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.002>
 106. Rink BE, Beyer T, French HM, Watson E, Aurich C, Donadeu FX. The Fate of Autologous Endometrial Mesenchymal Stromal Cells After Application in the Healthy Equine Uterus. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2019 Mar 10];27(15):1046–52. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2018.0056>
 107. Lange-Consiglio A, Rossi D, Tassan S, Perego R, Cremonesi F, Parolini O. Conditioned Medium from Horse Amniotic Membrane-Derived Multipotent Progenitor Cells: Immunomodulatory Activity In Vitro and First Clinical Application in Tendon and Ligament Injuries In Vivo. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2013;22(22):3015–24. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2013.0214>
 108. Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–14.
 109. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu YYG. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS One* [Internet]. 2008 [cited 2019 Mar 10];3(4):1886. Available from: www.plosone.org
 110. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Aug 28 [cited 2019 Mar 10];2014:965849. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530971>

111. Cho K-A, Park M, Kim Y-H, Woo S-Y, Ryu K-H. Conditioned media from human palatine tonsil mesenchymal stem cells regulates the interaction between myotubes and fibroblasts by IL-1Ra activity. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2019 Mar 10];21(1):130–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.12947>
112. Al-sharabi N, Mustafa M, Ueda M, Xue Y, Mustafa K, Fristad I. Conditioned medium from human bone marrow stromal cells attenuates initial inflammatory reactions in dental pulp tissue. *Dent Traumatol*. 2016;
113. Hao P, Liang Z, Piao H, Ji X, Wang Y, Liu Y, et al. Conditioned medium of human adipose-derived mesenchymal stem cells mediates protection in neurons following glutamate excitotoxicity by regulating energy metabolism and GAP-43 expression. *Metab Brain Dis*. 2014;29(1):193–205.
114. Ho CH, Lan CW, Liao CY, Hung SC, Li HY, Sung YJ. Mesenchymal stem cells and their conditioned medium can enhance the repair of uterine defects in a rat model. *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2017;1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2017.03.013>
115. Corradetti B, Correani A, Romaldini A, Marini MG, Bizzaro D, Perrini C, et al. Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Cells and Their Conditioned Media: Potential Candidates for Uterine Regenerative Therapy in the Horse. Asselin E, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Oct 31 [cited 2019 Mar 10];9(10):e111324. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111324>
116. Nugroho WS, Kusindarta DL, Susetya H, Fitriana I, Mulyani GT, Fibrianto YH, et al. The structural and functional recovery of pancreatic β -cells in type 1 diabetes mellitus induced mesenchymal stem cell-conditioned medium. *Vet World*. 2016;9(5):535–9.
117. Rajan TS, Giacoppo S, Trubiani O, Diomedede F, Piattelli A, Bramanti P, et al. Conditioned medium of periodontal ligament mesenchymal stem cells exert anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated mouse motoneurons. *Exp Cell Res* [Internet]. 2016;349(1):152–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.10.008>
118. Julie Audet. *Fetal Stem Cells in Regenerative Medicine*. 2009;482:440.
119. Nash DM, Sheldon IM, Herath S, Lane EA. Markers of the uterine innate immune response of the mare. 2010;119:31–9.

120. Carrade DD, Lane MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells 1. *Cell Med* [Internet]. 2012 [cited 2019 Aug 21];4:1–11. Available from: www.cognizantcommunication.com
121. Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett*. 2015;168(2):140–6.
122. Gugjoo MB, Amarpal, Makhdoomi DM, Sharma GT. Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications. *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2019 Aug 21];72:16–27. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080618300704>
123. Alvarenga MA, Matos I. Utilização da escova ginecológica cytobrush na coleta de material endometrial de éguas. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 1990;42:67–8.
124. Foster ML, Love CC, Varner DD, Brinsko SP, Hinrichs K, Teague S, et al. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. *Theriogenology* [Internet]. 2011 Jul 15 [cited 2019 May 23];76(2):334–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11000926>
125. Colenbrander B, Gadella B, Stout T. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2019 May 23];38(4):305–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x>
126. Peroni JF, Borjesson DL. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stem Cells. *Vet Clin North Am Equine Pract* [Internet]. 2011 Aug [cited 2019 Aug 21];27(2):351–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749073911000290>
127. Fontaine MJ, Shih H, Schäfer R, Pittenger MF. Unraveling the Mesenchymal Stromal Cells' Paracrine Immunomodulatory Effects. *Transfus Med Rev*. 2016;30(1):37–43.
128. Colbath AC, Dow SW, Phillips JN, McIlwraith CW, Goodrich LR. Autologous and Allogeneic Equine Mesenchymal Stem Cells Exhibit Equivalent Immunomodulatory Properties In Vitro. *Stem Cells Dev*. 2017;26(7):503–11.

129. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(5):1474–83.
130. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2019 Mar 10];95(12):2196–211. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030090841300237X?via%253Dihub>

CAPÍTULO 2

ARTIGO**Effect of addition of conditioned medium of mesenchymal stem cells on spermatic feasibility and uterine inflammatory response post breeding in equine**

Eriky Akio de Oliveira Tongu^a, Marco Antônio Alvarenga^a

^aDepartment of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, Brazil

*Corresponding author. Tel.: (+55) 11 94744-0058

E-mail address: marco.alvarenga@unesp.br

¹ Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2016

<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

1. INTRODUÇÃO

Uma resposta inflamatória transitória no útero equino após a inseminação artificial(IA) ou cobertura é esperada devido ao excesso de espermatozoides e plasma seminal depositados no endométrio promovendo estimulação antigênica [1]. A maioria das éguas são competentes na eliminação dessa inflamação, sendo consideradas como resistentes [2]. Entretanto algumas éguas possuem falhas nos mecanismos de limpeza uterina em tempo hábil, portanto são consideradas susceptíveis a endometrite persistente pós cobertura (EPPC) [3]. Acredita-se que isso ocorra em 10 a 15% das éguas, o que gera um grande ônus econômico para a indústria de criação de equino [4].

Estudos demonstram que 6 horas após IA encontramos as maiores concentração de polimorfonucleares (PMN) e aumento de expressão de citocinas tanto em éguas resistente como susceptíveis [5–7]. Porém em éguas resistentes ocorre um aumento na expressão de citocinas anti-inflamatórias(IL-1ra, IL-10 e IL-6), e diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo o começo da resolução do processo inflamatório, enquanto éguas susceptíveis apresentaram uma menor expressão dessas citocinas anti-inflamatórias no mesmo momento, com uma maior expressão de IL-1 e IL-8 que são pró-inflamatórias [5–7].

Diante da etiologia e patogenia associada a EPPC, tratamentos voltados à diminuição da resposta inflamatória, como a utilização de anti-inflamatórios esteroidais, tem sido preconizados para a modulação da inflamação, na tentativa de otimização dos índices de concepção de éguas com EPPC [8–10]. No entanto, como o uso exacerbado de anti-inflamatórios esteróides pode resultar em importantes efeitos colaterais sistêmicos como laminite[11] e resistência à insulina [12].

Dentre as terapias celulares imunomoduladoras utilizadas para o tratamento de EPPC destacam-se o uso de células tronco mesenquimais (CTMs) e o plasma rico em plaquetas (PRP), terapias que em pesquisas recentes demonstram ser eficientes na modulação da resposta inflamatória uterina em éguas, com incremento na fertilidade [5,13–15].

O meio condicionado por células tronco (MC) tem apresentado características muito similares a utilização de CTMs, com resultados satisfatórios na utilização de doenças promovidas por inflamações agudas e crônicas, por possuírem uma

1 ampla capacidade de imunoregulação, capazes de influenciar respostas imunes
2 tanto adaptativas como inatas e sendo considerados hipoimunogênico [16].

3 Essa imunoregulação e modificação do ambiente é realizada através de
4 comunicação autócrina e paracrina [17,18]. Dentre as ações paracrinas
5 podemos destacar a liberação de proteínas hidrosolúveis como; citocinas,
6 fatores de crescimento e quimiocinas [19]. Esses fatores hidrosolúveis são
7 liberados durante o cultivo celular das MSCs, dando ao MC uma função similar
8 a utilização de MSCs [16,20]. Entretanto as MSCs possuem um maior tempo de
9 ação devido a continuidade de fatores produzidos pelas células no tecido, agindo
10 por um período prolongado. Por outro lado o MC agrega benefícios quando
11 comparado à utilização de CTMs, já que por não ser uma suspensão celular
12 podem ser fabricadas, liofilizadas, embaladas e transportadas mais facilmente,
13 não havendo necessidade de se conduzir testes de compatibilidade com um
14 possível receptor, evitando-se possíveis rejeições [16,21,22].

15 Sendo assim o objetivo desse trabalho foi avaliar de forma pioneira o efeito
16 da adição de diferentes concentrações de MC equino sobre a cinética
17 espermática equina e modulação da resposta inflamatória uterina pós cobertura
18 em éguas resistentes e susceptíveis a EPPC e assim como sua fertilidade.

20 **2. MATERIAL DE MÉTODOS**

21 **2.1. Desenho experimental**

22
23 Para uma melhor compreensão das análises o projeto foi dividido em 2
24 experimentos conforme a seguir: O Experimento 1 foi conduzido no Centro de
25 Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN – FMVZ UNESP -
26 Botucatu), com o objetivo de avaliar o efeito da adição de diferentes
27 concentrações de MC equino sobre a cinética e integridade de membrana
28 espermática equina. No Experimento 2 foi avaliado *in vivo* a capacidade
29 moduladora do MC sobre o processo inflamatório endometrial de éguas
30 resistentes e susceptíveis a EPPC. Foi também avaliada a fertilidade de éguas
31 submetidas a inseminação artificial com meio diluente a base de leite acrescido
32 de MC. Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade
33 de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Campus de Botucatu, São Paulo,
34 sob protocolo CEUA 0159/2018.

2.2. Obtenção do meio condicionado

Para a obtenção do MC as células tronco mesenquimais foram descongeladas de um banco celular e recultivadas numa concentração de 15×10^3 células/cm² durante 3 dias a 37°C em atmosfera saturada com 5% de CO₂, sendo realizado tripsinização para a obtenção de subculturas. O sobrenadante é centrifugado a 700g e filtrado (filtro de 0,2mm) para retirada de detritos celulares [21,23]. O MC foi proveniente de um banco de células tronco de equinas, do laboratório OMICS Biotecnologia Animal (Botucatu/ São Paulo, Brasil), armazenados a -80° C.

2.3. Experimento 1 – Efeito do MC sobre a viabilidade espermática

2.3.1. Seleção dos animais e colheita de sêmen

Foi utilizado um ejaculado de 10 garanhões. Para a colheita de sêmen foi utilizada vagina artificial modelo Botupharma (Botupharma Ltda.-Botucatu-Brasil). A concentração espermática foi realizada utilizando câmara de Neubauer e o sêmen foi diluído (Botu-sêmen Special®, Botupharma) numa concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL.

2.3.2. Manipulação do sêmen com meio condicionado

Após a diluição do sêmen, diferentes concentrações de MC foram acrescentadas baseadas no volume(ml) da amostra: Controle (CT) – meio diluidor sem o acréscimo de MC; G25– meio diluidor acrescido de 25% de MC equino; G50 – meio diluidor acrescido de 50% de MC equino; G75 – meio diluidor acrescido de 75% de MC equino; G100 – meio diluidor acrescido de 100% de MC equino.

2.3.3. Teste de Termo Resistência (TTR)

Para o TTR, logo após a diluição, todas as amostras foram incubadas em banho maria seco a 37C° por 2 horas, sendo conduzidas avaliações cinéticas nos momentos 0 (T0) e 2 (T2) horas de incubação.

2.3.4. Análise de cinética espermática

A análise de cinética espermática foi realizada através do método computadorizado (CASA) (Hamilton Thorne Research- HTM IVOS 10, Beverly, MA, USA) quanto aos seguintes parâmetros: porcentagem de espermatozoides com Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), espermatozoides com movimento rápido (RAP), Velocidade média da trajetória (VAP), Velocidade curvilínea (VCL) e Velocidade linear progressiva (VSL).

2.3.5. Integridade de membrana plasmática (IMP)

As amostras foram avaliadas logo após a diluição (T0) e após 2 horas de incubação (T2). A análise integridade de membrana plasmática (IMP, %) foi realizada através de microscopia de epi-fluorescência, utilizando-se as sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP) e diacetato 6-carboxifluoresceína (DCA), de acordo com a técnica descrita por [24].

2.4. Experimento 2 – Efeito da adição do MC na modulação da inflamação e fertilidade

2.4.1. Animais e controle do ciclo estral

Foram selecionadas 20 éguas com histórico reprodutivo conhecido, classificadas como resistentes (n=13) e susceptíveis (n=7) a EPPC como descrito por SEGABINAZZI et al., [13]. Foi realizado acompanhamento diário por palpação retal e ultrassonografia (Sono Scape A5V –Hong Kong-China). A indução da ovulação foi realizada a partir da detecção de um folículo ≥ 35 mm e edema uterino grau 3, com a utilização de 250 µg de acetato de histrelin (Strelin®, Botupharma, Brasil) pela via intramuscular.

2.4.2. Colheita de sêmen, preparo das doses e inseminação artificial

As doses inseminantes foram preparadas com um total de 1000×10^6 espermatozoides e o sêmen diluído (Botu-sêmen® Special, Botupharma) até a concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. As inseminações artificiais foram realizadas 24 horas após a indução da ovulação, com a utilização de sêmen fresco de um único garanhão de fertilidade conhecida e a deposição do sêmen feita no corpo do útero.

2.4.3. Grupo experimental

As éguas foram inseminadas de maneira aleatória para cada momento sorteado previamente, em *cross-over design*.

- Grupo controle – Foram inseminadas com um total de 1000×10^6 espermatozoides diluídos em diluente a base de leite desnatado na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL.

- Grupo Pré-MC – A infusão uterina com volume de 30 mL de MC equino no momento da indução da ovulação, após 24 horas foram inseminadas com um total de 1000×10^6 espermatozoides diluídos em diluente a base de leite desnatado na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL.

- Grupo IA+MC – Foram inseminadas com um total de 1000×10^6 espermatozoides diluídos na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL em diluente a base de leite desnatado e posteriormente acrescido 75% (vol/vol) de MC equino conforme o experimento 1.

Paras as éguas resistentes foram utilizados dois ciclos, controle e MC-IA. Para as éguas susceptíveis, foram utilizados os três ciclos: controle, MC-Pré e MC+IA.

2.4.4. Coleta de amostras

2.4.4.1. Avaliações ultrassonográficas

Foram realizados exames ultrassonográficos no momento da IA(0h) e 24h após a IA a fim de se detectar a presença de fluído uterino acumulado na região de bifurcação dos cornos uterinos, o qual foi mensurado altura em milímetros (mm²).

2.4.4.2. Citologia uterina

Foram realizadas citologias esfoliativas no momento da IA (0h), 6 e 24 horas após a IA com o auxílio de um aparelho descartável para coleta de citologia uterina equina (Provar®, SP - Brasil), como descrito por Alvarenga & Matos (1990). As escovas foram utilizadas para confecção de lâminas para avaliação citológica, que foram secas em temperatura ambiente e coradas pelo método Panótico Rápido. A leitura das lâminas foi feita através de microscopia óptica utilizando óleo de imersão (1000x), considerando a porcentagem de neutrófilos/100 células de forma aleatória [24].

2.4.4.3. Teste de fertilidade

O diagnóstico de gestação foi realizado após 14 dias a partir da detecção da ovulação por palpação retal e ultrassonografia (Sono Scape A5V Hong Kong - China). As éguas que não ovularem após 24h depois da IA foram descartadas e foi utilizado o próximo ciclo. Após a realização do exame foi aplicado 5mg de dinoprost (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil) para a interrupção da gestação.

2.5. Análise estatística

As distribuições das variáveis contínuas foram avaliadas com testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas (histograma, QQ Plot). A ANOVA para Medidas Repetidas seguida de Tukey foi utilizada para confrontar as médias das variáveis contínuas em cada tratamento e momento, testando-se diferentes estruturas de covariância. Para a variável categórica DG, o teste de Fisher foi utilizado para confrontar a proporção de diagnósticos positivos em cada tratamento. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do *Statistical Analysis Software* – SAS (SAS Institute, 2011).

3. RESULTADOS

Os resultados EXP1 estão apresentados na tabela 1. Foram observadas diferenças na cinética espermática somente no VCL ($P<0,05$) no T2. A integridade de membrana plasmática entre os tratamentos não houve diferença ($P>0,05$).

No experimento 2 (EXP2), nas éguas resistentes o tratamento IA+MC diminuiu a porcentagem de PMN (Figura 1) no lúmen uterino 6h pós IA quando comparado com o ciclo controle ($P<0,05$), não observando diferenças no momento 24h ($P>0,05$). Foi possível observar que o ciclo controle diferiu entre todos os momentos ($P<0,05$), já no ciclo IA+MC o momento 0h e 24h não diferiram ($P>0,05$). Não foi observada diferença na fertilidade entre o ciclo controle (76,92%) e IA+MC (69,28%) ($P>0,05$).

As éguas susceptíveis mantiveram altas concentrações de PMN 6 e 24h pós IA no ciclo controle ($P>0,05$). Foi observado em ambos os tratamentos utilizando MC equino redução da porcentagem de PMN 6 e 24h pós IA ($P<0,05$), não diferindo entre os tratamentos ($P>0,05$) (Figura 2). A utilização MC equino também diminuiu o acúmulo de fluido intrauterino nas éguas susceptíveis 24h pós IA ($p<0,05$) (Figura 3). Não foi observada diferença na fertilidade entre os ciclos, controle (42,86%), IA+MC (57,14%) e Pré-MC (85,71%) ($P>0,05$).

4. DISCUSSÃO

O teste de termo resistência juntamente com a avaliação do método computadorizado CASA e permeabilidade de membrana plasmática oferecem uma maior confiabilidade na mensuração dos diversos parâmetros espermáticos e indicadores de fertilidade dos espermatozoides *in vitro* [25,26]. Em nosso estudo a adição do MC não alterou de forma importante a cinética espermática nos diversos grupos testados, diferente do que foi encontrado na adição de inflamatórios esteróides no sêmen equino, que tiveram decréscimo principalmente da motilidade total e progressiva [10]. Além disso o MC não alterou sua fertilidade das éguas resistentes inseminadas, o que demonstra sua segurança na utilização em éguas.

O pico do processo inflamatório uterino ocorreu 6h após a inseminação em éguas resistentes e susceptíveis a EPPC. Christoffersen et al., [6], demonstrou que 6h após a inseminação é o momento crítico associado a

1 susceptibilidade, onde podemos encontrar as maiores concentrações de
2 interleucinas e PMN tanto em éguas resistentes como susceptíveis. Entretanto,
3 em éguas resistentes ocorre uma expressão aumentada de citocinas anti-
4 inflamatórias(IL-1ra, IL-10 e IL-6), e diminuição na expressão de citocinas pró-
5 inflamatórias, sugerem o início da resolução do processo inflamatório, enquanto
6 éguas susceptíveis apresentam menor expressão dessas citocinas no mesmo
7 momento, com uma maior expressão IL-1 e IL-8 [5–7]. Esse fato colabora com
8 os resultados encontrados em nosso estudo, tendo em vista que as éguas
9 resistentes tiveram um decréscimo na porcentagem de PMN até 24h e as
10 susceptíveis se mantiveram altas, como relatado em estudos anteriores,
11 produzindo uma reação inflamatória exacerbada [2,27–29].

12 A utilização do MC foi capaz de modular a resposta inflamatória inata
13 diminuindo as porcentagens de PMN em tanto em éguas resistentes como
14 susceptíveis, sendo de forma inédita sua utilização “in vivo” para o tratamento de
15 EPPC. O MC age por mecanismo paracrino, através de proteínas hidrosolúveis
16 e microvesículas liberadas no meio durante o cultivo celular, com função
17 reguladora da resposta imune inata e adaptativa similar a utilização de CTMs.
18 Sendo assim o MC reduz a expressão do fator de necrose tumoral e interferon-
19 δ e aumentam secreção de IL-6, IL-1ra e PGE₂ [17,19]. Além disso, as
20 microvesículas secretadas ricas em fatores de crescimento produzidas têm o
21 potencial de reduzir a taxa de apoptose endometrial equina, aumentando a
22 proliferação celular, diminuindo a expressão gênica pró-inflamatória [30,31].
23 Todas essas ações de forma conjunta, fazem com que diminua a quimiotaxia, e
24 expressão endotelial de integrinas e selectinas, consequentemente diminuição
25 do influxo de leucócitos para o tecido inflamado, além de diminuir o estresse
26 oxidativo e inativação do fator nuclear Kappa, que é a chave de ativação para a
27 codificação de genes pró inflamatórios, quimiocinas e cicloxigenase-2 (COX-2)
28 [30,32,33]. Em nosso estudo mesmo em éguas resistentes o MC reduziu a
29 porcentagem de PMN mesmo em éguas resistentes o ciclo IA+MC 24h após IA
30 não diferindo do momento 0h, demonstrando uma resolução mais rápida do
31 processo inflamatório.

32 Nas éguas susceptíveis apesar de ambos os grupos IA+MC e PRÉ-MC
33 diminuíram a porcentagem de PMN. Resultado similar ao encontrado em éguas
34 tratadas com infusão de CTMs 24 horas antes da IA demonstrando redução da

porcentagem de PMN 6 horas pós IA, devido a um aumento da IL-1Ra e uma menor concentração de IL-1 24h após IA [5]. Acredita-se que essa melhor eficiência se deve ao ambiente uterino dessas éguas já estar muito responsivo ao estímulo antígeno já antes de IA, devido a um desbalanço nas concentrações de interleucinas e nos fatores ligados a susceptibilidade [6,27,34]. Devido a isso outras terapias aplicadas a EPPC como: Corticoesteróides[8,35], AINES [36]; PRP[13], soro autólogo[5], lactoferrina [37] e EPMB [38] possuem melhores resultados quando utilizados antes da IA ou até o pico inflamatório 6h após a IA.

SEGABINAZZI et al., (13) evidenciou um aumento na expressão de COX-2 em éguas susceptíveis, com diminuição na expressão da mesma e diminuição do influxo de PMN para o lúmen uterino em éguas tratadas com PRP. A utilização de firocoxib que é um anti-inflamatório COX2 seletivo também foi eficaz na redução de PMN no lúmen uterino e no extrato compacto do endométrio [36]. A inibição de COX2 e consequentemente das prostaglandinas desempenham um papel fundamental na diminuição da inflamação, devido a indução da produção de fatores quimiotáticos que estimulam a migração de células imunes para o local inflamatório, que juntamente com as citocinas inflamatórias promovem alterações vasculares, que auxiliam na passagem de células inflamatórias através dos vasos sanguíneos [1,13,39]. As CTMs assim como seu MC, além de possuírem a capacidade de suprimir metabolitos do ácido araquidônico e leucócitos, ainda são capazes de diminuir o estímulo antigênico realizado pelos complexos de histopatibilidade, e redução na transcrição de mRNA de moléculas adesão intercelular e vascular, consequentemente ocorrendo uma diminuição no recrutamento de células inflamatórias [14,40,41].

A susceptibilidade possui diversos fatores pré disponentes, incluindo principalmente a senilidade e/ou fibrose endometrial, fazendo com que o padrão de contração, intensidade e duração das contrações e consequentemente sua drenagem cervical e linfática seja dificultada [42,43]. O MC demonstrou redução no acúmulo de líquido intra-uterino pós cobertura em éguas susceptíveis, como encontrado em outras terapias imunomoduladoras como PRP e dexametasona[8,15]. Uma possível explicação para essa redução do fluido intrauterino é que consequentemente a redução dos PMN e subprodutos inflamatórios, ocorreu uma redução nas concentrações de óxido nítrico que é um

subproduto inflamatório presente em grandes quantidade em éguas susceptíveis, causando relaxamento da musculatura lisa e consequentemente redução na contração miometrial e eliminação do radiocolóide [44,45].

Tratamentos imunomodulares para EPPC tem demonstrado aumento nos índices de fertilidade devido a redução do processo inflamatório como: glicocorticoides [8], extrato de parede de mycobacterium [7], PRP [13] e Propionibacterium acnes [46]. Esses resultados corroboram com o encontrado em nosso trabalho, Que apesar dos grupos não terem demonstrado diferença significativa nos índices de fertilidade, o MC aumentou numericamente as taxas de prenhes positivas nos grupos testados em éguas susceptíveis; controle (42,86%), IA+MC (57,14%) e Pré-MC (85,71%). Apesar da expressiva diferença numérica, o número reduzido de animais deve ter interferido na avaliação estatística onde não se observou diferença significativa entre os grupos.

CONCLUSÃO:

Conclui-se que o MC equino pode ser utilizado com segurança tanto antes como no momento da inseminação artificial juntamente com o sêmen. Além disso nosso experimento mostrou de forma inédita que o meio condicionado por células tronco mesenquimais são eficientes na modulação da resposta inflamatória uterina por IA.

REFERÊNCIAS.

- [1] Nash DM, Sheldon IM, Herath S, Lane EA. Markers of the uterine innate immune response of the mare 2010;119:31–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.11.008>.
- [2] Watson ED. Post-breeding endometritis in the mare. Anim Reprod Sci 2000;60–61:221–32. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00110-X).
- [3] Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. Theriogenology 1999;52:461–71. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00143-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00143-0).
- [4] Samper JC, Stanford MS, French HM, Chapwanya A. Post-breeding

- inflammation in mares after insemination with large and low doses of fresh or frozen semen. *Pferdeheilkd Equine Med* 2016;32:24–6. <https://doi.org/10.21836/pem20160103>.
- [5] Ferris RA, Frisbie DD, McCue PM. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology* 2014;82:36–42. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.015>.
- [6] Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D, Scoggin KE, Squires EL, et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *REPRODUCTION* 2013;145:289–96. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0452>.
- [7] Christoffersen M, Woodward EM, Bojesen AM, Petersen MR, Squires EL, Lehn-Jensen H, et al. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology* 2012;78:991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.016>.
- [8] Bucca S, Carli A, Buckley T, Dolci G, Fogarty U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology* 2008;70:1093–100. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.029>.
- [9] Christoffersen M, Woodward E, Bojesen AM, Jacobsen S, Petersen MR, Troedsson MHT, et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Vet Res* 2012;8:41. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-41>.
- [10] Fioratti EG, Villaverde AISB, Melo CM, Tsunemi MH, Papa FO, Alvarenga MA. Influence of Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Viability and Fertility of Equine Semen. *J Equine Vet Sci* 2012;32:771–5. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.03.008>.
- [11] Johnson PJ, Slight SH, Ganjam VK, Kreeger JM. Glucocorticoids and laminitis in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2002;18:219–36. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00015-9).
- [12] Tiley HA, Geor RJ, McCutcheon LJ. Effects of dexamethasone on glucose dynamics and insulin sensitivity in healthy horses. *Am J Vet Res*

- 2007;68:753–9. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.7.753>.
- [13] Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho AM, Dell'Aqua JA, Miró J, et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology* 2017;104:120–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.007>.
- [14] Ahmadi M, Rahbarghazi R, Aslani MR, Shahbazfar A-A, Kazemi M, Keyhanmanesh R. Bone marrow mesenchymal stem cells and their conditioned media could potentially ameliorate ovalbumin-induced asthmatic changes. *Biomed Pharmacother* 2017;85:28–40. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.127>.
- [15] Reghini FM, Ramires C, Segabinazzi LG, Manoela M, Chaves BC, Paula C De, et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology* 2016;86:516–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>.
- [16] Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int* 2014;2014:965849. <https://doi.org/10.1155/2014/965849>.
- [17] Carrade DD, Lane MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells 1. *Cell Med* 2012;4:1–11. <https://doi.org/10.3727/215517912X647217>.
- [18] Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett* 2015;168:140–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.004>.
- [19] Gugjoo MB, Amarpal, Makhdoomi DM, Sharma GT. Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications. *J Equine Vet Sci* 2019;72:16–27. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2018.10.007>.
- [20] Hao P, Liang Z, Piao H, Ji X, Wang Y, Liu Y, et al. Conditioned medium of human adipose-derived mesenchymal stem cells mediates protection in neurons following glutamate excitotoxicity by regulating energy metabolism and GAP-43 expression. *Metab Brain Dis* 2014;29:193–205. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9490-y>.

- 1 [21] Lange-Consiglio A, Rossi D, Tassan S, Perego R, Cremonesi F, Parolini
2 O. Conditioned Medium from Horse Amniotic Membrane-Derived
3 Multipotent Progenitor Cells: Immunomodulatory Activity In Vitro and First
4 Clinical Application in Tendon and Ligament Injuries In Vivo. *Stem Cells*
5 *Dev* 2013;22:3015–24. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0214>.
- 6 [22] Nugroho WS, Kusindarta DL, Susetya H, Fitriana I, Mulyani GT, Fibrianto
7 YH, et al. The structural and functional recovery of pancreatic β -cells in
8 type 1 diabetes mellitus induced mesenchymal stem cell-conditioned
9 medium. *Vet World* 2016;9:535–9.
10 <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.535-539>.
- 11 [23] Maia L, Dias MC, Moraes CN De, Aqua CDPF, Silveira LSL. Conditioned
12 medium : a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord
13 mesenchymal stem cells 2017;41:239–48.
14 <https://doi.org/10.1002/cbin.10708>.
- 15 [24] Alvarenga MA, Matos I. Utilização da escova ginecológica cytobrush na
16 coleta de material endometrial de éguas. *Arq Bras Med Vet e Zootec*
17 1990;42:67–8.
- 18 [25] Foster ML, Love CC, Varner DD, Brinsko SP, Hinrichs K, Teague S, et al.
19 Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm
20 membranes. *Theriogenology* 2011;76:334–41.
21 <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.02.012>.
- 22 [26] Colenbrander B, Gadella B, Stout T. The Predictive Value of Semen
23 Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reprod Domest Anim*
24 2003;38:305–11. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x>.
- 25 [27] Christoffersen M, Troedsson MHT. Inflammation and fertility in the mare.
26 *Reprod Domest Anim* 2017;52:14–20. <https://doi.org/10.1111/rda.13013>.
- 27 [28] Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D,
28 Scoggin KE, et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune
29 response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced
30 endometritis. *Reproduction* 2013;145:289–96.
31 <https://doi.org/10.1530/REP-12-0452>.
- 32 [29] Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. Immune
33 parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding
34 endometritis: Effects of immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol*

- 2007;118:30–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.04.009>.
- [30] Fontaine MJ, Shih H, Schäfer R, Pittenger MF. Unraveling the Mesenchymal Stromal Cells' Paracrine Immunomodulatory Effects. *Transfus Med Rev* 2016;30:37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2015.11.004>.
- [31] Corradetti B, Correani A, Romaldini A, Marini MG, Bizzaro D, Perrini C, et al. Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Cells and Their Conditioned Media: Potential Candidates for Uterine Regenerative Therapy in the Horse. *PLoS One* 2014;9:e111324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111324>.
- [32] Girling JE, Hedger MP. Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: Emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunol Cell Biol* 2007;85:481–9. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100086>.
- [33] Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Filì L, Manuelli C, Frosali F, et al. Toll-Like Receptors 3 and 4 Are Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Can Inhibit Their T-Cell Modulatory Activity by Impairing Notch Signaling. *Stem Cells* 2008;26:279–89. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0454>.
- [34] Woodward EM, Troedsson MHT. Inflammatory mechanisms of endometritis. *Equine Vet J* 2015;47:384–9. <https://doi.org/10.1111/evj.12403>.
- [35] Dell'Aqua JA, Papa FO, Lopes MD, Alvarenga MA. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Anim Reprod Sci* 2006;94:270–3. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.061>.
- [36] Friso AM, Segabinazzi LGTM, Cyrino M, Correal SB, Freitas-Dell'Aqua CP, Teoro do Carmo M, et al. Periovalutary administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. *Theriogenology* 2019;138:24–30. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.045>.
- [37] Coutinho da Silva MA, Darr CR, Moraes LE, Forshey BS. Lactoferrin Modulates Uterine Inflammation Postbreeding in the Mare. *J Equine Vet Sci* 2017;56:63–7. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.007>.
- [38] Woodward EM, Christoffersen M, Horohov D, Squires EL, Troedsson MHT.

- 1 The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine
 2 expression in mares susceptible to persistent breeding-induced
 3 endometritis. *Equine Vet J* 2015;47:235–9.
 4 <https://doi.org/10.1111/evj.12266>.
- 5 [39] Marth CD, Young ND, Glenton LY, Noden DM, Browning GF, Krekeler N.
 6 Deep sequencing of the uterine immune response to bacteria during the
 7 equine oestrous cycle. *BMC Genomics* 2015;16:1–19.
 8 <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2139-3>.
- 9 [40] Colbath AC, Dow SW, Phillips JN, McIlwraith CW, Goodrich LR.
 10 Autologous and Allogeneic Equine Mesenchymal Stem Cells Exhibit
 11 Equivalent Immunomodulatory Properties In Vitro. *Stem Cells Dev*
 12 2017;26:503–11. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0266>.
- 13 [41] Peroni JF, Borjesson DL. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory
 14 Activities of Stem Cells. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011;27:351–62.
 15 <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2011.06.003>.
- 16 [42] Rigby SL, Barhoumi R, Burghardt RC, Colleran P, Thompson JA, Varner
 17 DD, et al. Mares with Delayed Uterine Clearance Have an Intrinsic Defect
 18 in Myometrial Function1. *Biol Reprod* 2001;65:740–7.
 19 <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.740>.
- 20 [43] Leblanc MM, Johnson R, Maron B, Calderwood Mays M, Valderrama C.
 21 Lymphatic Clearance of India Ink in Reproductively Normal Mares and
 22 Mares Susceptible to Endometritis. vol. 1. 1995.
- 23 [44] Alghamdi AS, Foster DN, Carlson CS, Troedsson MHT. Nitric Oxide Levels
 24 and Nitric Oxide Synthase Expression in Uterine Samples from Mares
 25 Susceptible and Resistant to Persistent Breeding-induced Endometritis.
 26 *Am J Reprod Immunol* 2005;53:230–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00270.x>.
- 28 [45] Khan FA, Chenier TS, Murrant CL, Foster RA, Hewson J, Scholtz EL.
 29 Dose-dependent inhibition of uterine contractility by nitric oxide: A potential
 30 mechanism underlying persistent breeding-induced endometritis in the
 31 mare. *Theriogenology* 2017;90:59–64.
 32 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.026>.
- 33 [46] Rohrbach B, Sheerin P, Steiner J, Matthews P. Use of *Propionibacterium*
 34 *acnes* as adjunct therapy in treatment of persistent endometritis in the

broodmare. Anim Reprod Sci 2006;94:259–60.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.013>.

- 1 Tabela 1. Análise de cinética espermática realizada pela análise computadoriza
 2 CASA nos diferentes grupos e momentos.

Variável	Tempo (t)	CT	G25-E	G50-E	G75-E	G100-E
MT	0	83 (1,9)	80,5 (4,3)	78,3 (3,7)	75,7 (3,2)	73,1 (3,8)
	2	79,1 (2,8)	73,4 (3)	79,1 (2,7)	74,7 (3)	75,7 (2,5)
MP	0	46,1 (4,9)	40 (3,9)	39,9 (3,5)	36,1 (3,2)	36,1 (3,4)
	2	41,6 (4,1)	34,2 (3,2)	39,7 (2,8)	36,3 (2,7)	37,1 (3,2)
VAP	0	132,7 (3,5) *	135,9 (2,6) *	137,6 (1,5)	130,5 (2,5)	131 (2,2)
	2	115,6 (4,1)	120,5 (4,1)	124,3 (4,8)	120,2 (2,3)	130,6 (3,4)
VSL	0	99 (4,2)	102,1 (3,8)	107,8 (3,7)	99,5 (3,1)	100 (3,5)
	2	89,5 (3,2)	90,5 (4)	96,4 (3,1)	90,5 (2)	99,8 (2,6)
VCL	0	230,7 (6,6)	237,7 (8,5)	239 (8)	230,4 (9)	229,5 (8,7)
	2	209 (7,5) ^a	220,3 (8,1) ^{ab}	219,5 (14,2) ^{ab}	221,4 (4,6) ^{ab}	238,3 (7,5) ^b
RAP	0	75,6 (2,5)	71,9 (4,4)	72,5 (3,5)	68,6 (3,1)	66,1 (4,2)
	2	64,8 (4,8)	65 (3,3)	71,6 (2,9)	66,8 (2,9)	69,6 (2,5)

3
 4 Letras minúsculas (a, b) indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro de um mesmo
 5 momento; *indica diferença estatística para o tratamento entre os dois momentos.

6
 7
 8
 9
 10
 11
 12

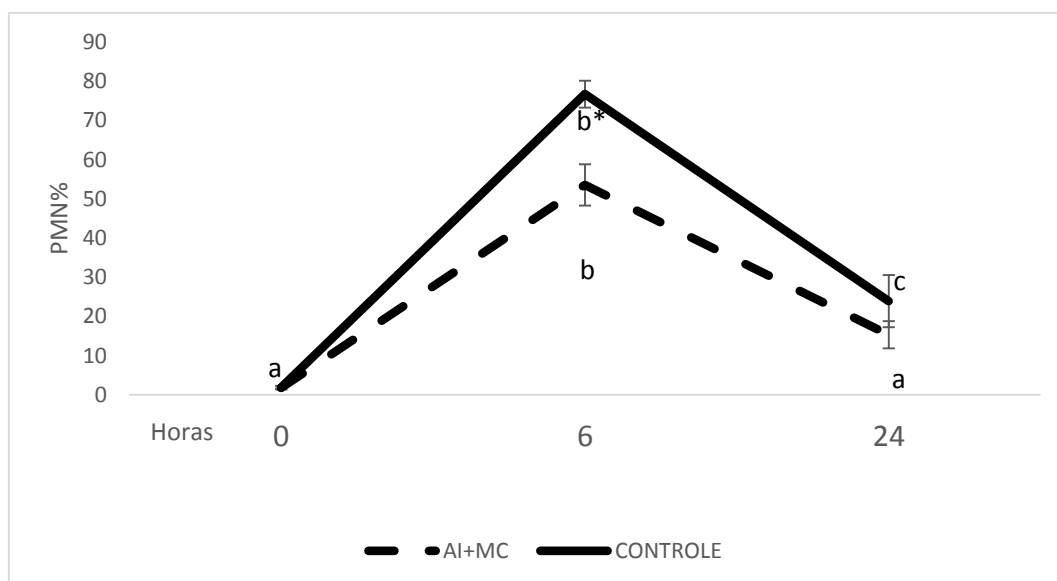


Figura 1 – Porcentagem de PMN no lúmen uterino por citologia endometrial em éguas resistentes no grupos IA+MC e controle. Letras diferentes (a,b,c) indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os momentos dentro de um mesmo tratamento. * indica diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo momento.

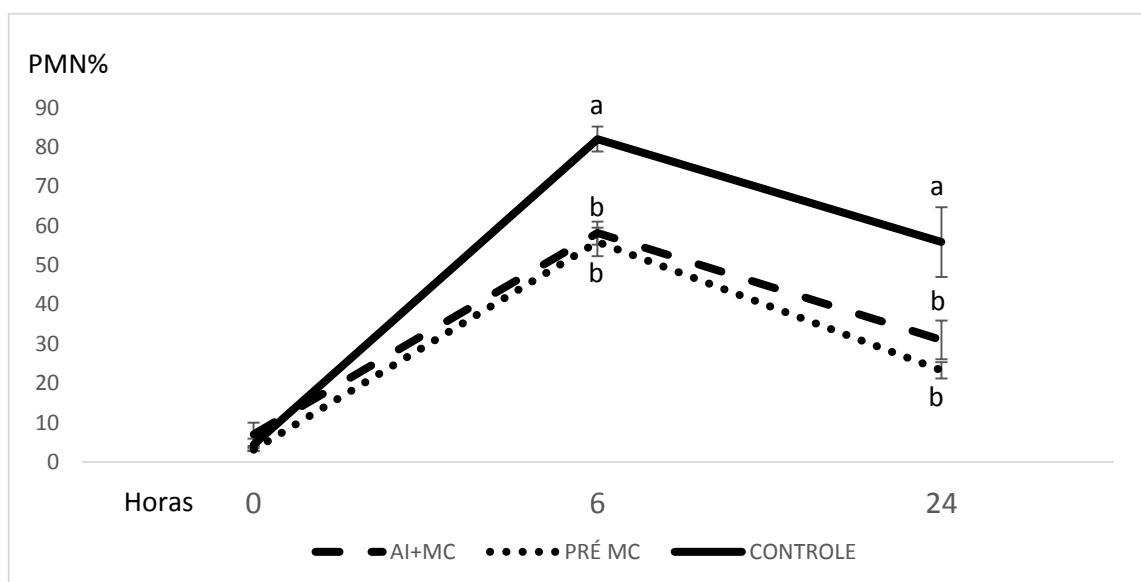


Figura 2 – Porcentagem de PMN no lúmen uterino por citologia endometrial em éguas suscetíveis nos grupos; IA+MC, PRÉ MC e controle. Letras diferente (a, b, c) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro de um

mesmo momento. Houveram diferenças estatísticas entre todos os momentos para os 3 tratamentos.

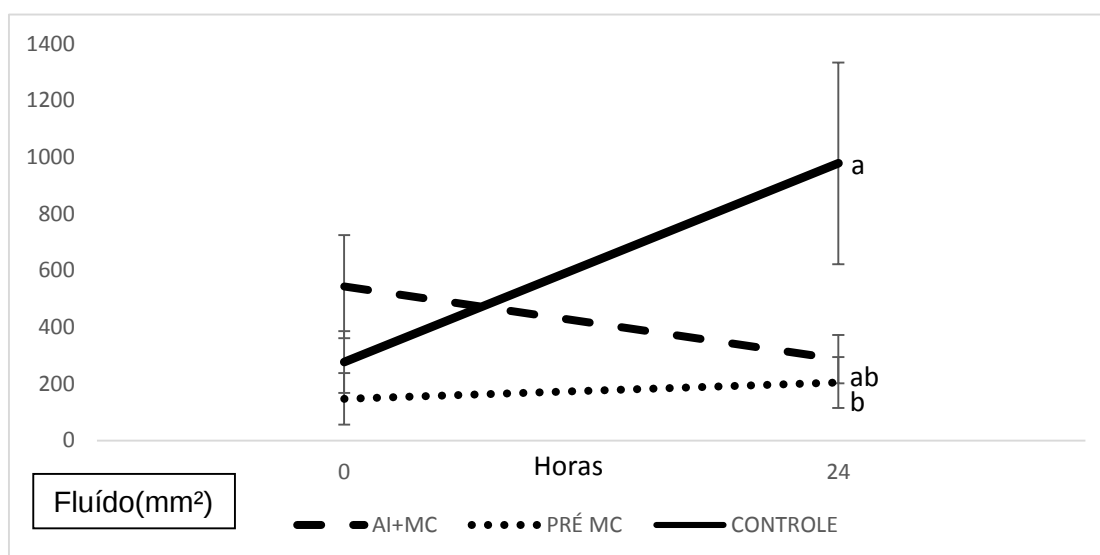


Figura 3. Coluna de fluido uterino mensurado por ultrassonografia transretal (mm²) antes e após 24 horas da IA em éguas susceptíveis. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro de um mesmo momento.