

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**O USO DE TERAPIAS BIOLÓGICAS NO TRATAMENTO DE ENDOMETRITE  
PERSISTENTE PÓS COBERTURA E ENDOMETROSE EM ÉGUAS**

**MARIA LUÍSA FLACH**

**PORTO ALEGRE**

**2014/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**O USO DE TERAPIAS BIOLÓGICAS NO TRATAMENTO DE ENDOMETRITE  
PERSISTENTE PÓS COBERTURA E ENDOMETROSE EM ÉGUAS**

**MARIA LUÍSA FLACH**

Monografia apresentada à Faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para  
a obtenção da Graduação em Medicina  
Veterinária

Orientador: Rodrigo de Costa Mattos

Co-orientador: Frederico Lança  
Schmitt

**PORTO ALEGRE**

**2014/2**

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Claudia e meu pai Gilberto pelo apoio, confiança e exemplo. Ter nascido entre pessoas tão especiais foi o maior presente que Deus podia ter oferecido pra mim e pro Zé Vitor. Muito obrigada por não medirem esforços para que eu consiga alcançar o sonho de me tornar Médica Veterinária. Ao meu irmão, José Vitor, pelo companheirismo, amizade e a certeza de que sempre teremos um ao outro. Aos meus avós Marisa, Ary, Lúcia e Avelino, juntamente com as tias, tios e primos, por tornarem a família um ambiente de acolhimento e retorno. Dentre esses, especialmente muito obrigado, à minha madrinha Cristina, meu tio Nelson e minha prima Bruna por todo apoio, compreensão, ajuda e amizade fundamentais nos primeiros semestres da faculdade, os quais foram essenciais para chegar onde estou agora.

Às amigas que fiz em Porto Alegre, as quais tornaram a cidade e a falta da família mais amena e colorida. Muito obrigada por todo companheirismo, vocês foram o maior presente que a veterinária poderia ter me dado. Agradeço todos os dias por ter encontrado vocês, Carine, Carol, Júlia Moroni, Júlia Pezzalli e Luiza. Sem a companhia de vocês teria sido bem mais difícil.

Ao meu orientador Rodrigo Costa Mattos, pela orientação nessa monografia e nos diversos trabalhos do laboratório ao longo desses cinco anos de estágio. O que aprendi no laboratório foi base para o amor e a definição pela área que escolhi.

Ao co-orientador Frederico Lança Schmitt, pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissional e pela orientação nessa monografia.

A todos veterinários que dividiram comigo seu conhecimento, muito obrigada pelos ensinamentos e oportunidades de estágio: Andrea Keller, Carlos Eduardo Veiga, Fernando Gonzales, Friedrich Frey Jr, Gabriela Richter, Julio Paganella, Matheus Farret, Petra Garbade, Roberto Veloso, Silvano Paixão e Vanessa Brucker.

Aos amigos do REPROLAB, por todos esses anos de trabalho em conjunto e ensinamentos. Por ter transformado o laboratório na minha segunda casa. Em especial a Vanessa, Eliana, Ana e Mica que, com o convívio, tornaram-se grandes amigas as quais quero levar pra sempre comigo.

Ao meu namorado Rafael pelo incentivo, apoio, cumplicidade, compreensão e amores nesses anos que estamos juntos. Muito obrigada por fazer essa caminhada mais leve e

gratificante. À família do Rafael que me acolheu prontamente e a qual eu sou muito grata. Muito obrigada por terem se tornado minha segunda família.

E, finalmente, à Francis, a égua que mesmo não estando mais aqui hoje, me ensinou e mostrou o caminho que eu gostaria de seguir e fazer o resto da minha vida. Por mostrar que o amor pelos cavalos deveria virar minha rotina.

*“ ... e se Deus me permite o luxo, entro a cavalo no céu ”*

## RESUMO

A equinocultura é uma atividade com alto crescimento dentro do agronegócio brasileiro a qual gera milhares de empregos diretos e indiretos e se consolida como uma importante atividade econômica e social. A fertilidade da fêmea da espécie equina é influenciada por vários fatores, sendo que o complexo endometrite-endometrose é uma das principais causas de infertilidade na égua. Sendo assim, é também uma importante causa de prejuízos para criadores. A endometrite persistente pós cobertura é a categoria de endometrite mais comum e se estabelece por uma continuidade da reação inflamatória fisiológica que acontece no endométrio após a monta/inseminação artificial. O tratamento comumente proposto para essa patologia é a lavagem uterina a qual retira produtos da inflamação e estimula o útero à limpeza mecânica. O uso de terapias biológicas para essa patologia vem sendo empregado pois células tronco, plaquetas e leucócitos infundidos no útero auxiliam no combate ao processo inflamatório persistente aumentando a qualidade de fagocitose de polimorfonucleares e a quimiotaxia do tecido. Já a endometrose, é um processo crônico no qual as glândulas uterinas ficam circunscritas por tecido fibroso, comprometendo sua função e a capacidade da fêmea de levar uma gestação à termo. Antes do uso de terapias biológicas, não se tinha um tratamento efetivo para essa patologia. Atualmente, com o uso de células tronco, a vida reprodutiva de fêmeas da espécie equina pode ser aumentada pois essas células têm capacidade de regeneração tecidual e mostraram ótimos resultados quando aplicadas no útero de éguas com endometrose.

**Palavras-chave:** égua, endometrite, endometrose, terapias biológicas, células tronco.

## **ABSTRACT**

*The equine industry is an activity with high growth in the Brazilian agribusiness with generates thousands of direct and indirect jobs and consolidates as an important economic and social activity. The female fertility of the equine species is influenced by many factors, and the endometritis-endometrosis complex is a major cause of infertility in the mare. Thus, it is also an important cause of loss to farmers. The persistent mating-induced endometritis is the most common category of endometritis and settles for a continuum of physiological inflammatory reaction occurring in the condition is uterine flushing which removes products of inflammation and stimulates the uterus to mechanical cleaning. The use of biological therapies for this condition have been employed as stem cells, platelets and leukocytes infused into the uterus help in combating the persistent inflammatory process by increasing the quality of phagocytosis of polymorphonuclear and chemotaxis of tissue. Already endometrosis is a chronic process in which the uterine glands are circumscribed by fibrous tissue, compromising its function and the ability of the female to lead a pregnancy to term. Before the use of stem cells, reproductive life of the female equine species can be increased because these cells have the capacity to tissue regeneration and showed good results when applied in the uterus of mares with endometrosis.*

**Keywords:** *mare, endometritis, endometrosis, biologic therapies, stem cells.*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>MORFOLOGIA UTERINA NA ÉGUA</b> .....	11
<b>3</b>	<b>ENDOMETROSE</b> .....	12
<b>4</b>	<b>ENDOMETRITE</b> .....	14
<b>4.1</b>	<b>Endometrite persistente pós cobertura</b> .....	14
<b>5</b>	<b>MECANISMOS DE DEFESA DO ÚTERO</b> .....	16
<b>5.1</b>	<b>Barreiras físicas</b> .....	16
<b>5.2</b>	<b>Limpeza uterina</b> .....	16
<b>5.3</b>	<b>Mecanismos imunológicos e celulares</b> .....	17
5.3.1	Imunidade humoral .....	17
5.3.2	Imunidade celular .....	18
<b>6</b>	<b>CÉLULAS TRONCO</b> .....	19
<b>6.1</b>	<b>Células tronco mesenquimais</b> .....	19
<b>6.2</b>	<b>Mecanismos de terapia</b> .....	21
6.2.1	Migração .....	21
6.2.2	Imunossupressão .....	21
6.2.3	Regeneração tecidual .....	22
<b>6.3</b>	<b>Células tronco no tratamento de endometrite persistente pós cobertura</b> .....	22
<b>6.4</b>	<b>Células tronco no tratamento de endometrose</b> .....	23
<b>7</b>	<b>PLASMA RICO EM PLAQUETA</b> .....	26
<b>7.1</b>	<b>Plasma rico em plaquetas no tratamento da endometrite persistente pós cobertura</b> .....	27
<b>8</b>	<b>PLASMA AUTÓLOGO ACRESCIDO DE LEUCÓCITOS</b> .....	29
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	31
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria do cavalo vem aumentando a cada ano dentro do agronegócio brasileiro, se destacando como uma importante atividade econômica e social. Este segmento movimentava 7,5 bilhões de reais por ano e gera aproximadamente 650 mil empregos diretos e 2,6 milhões de indiretos no campo e na cidade. O Brasil possui 8 milhões de animais e é o terceiro maior rebanho do mundo (MAPA, 2014).

Geralmente o endométrio da égua fértil é livre de contaminantes, apesar do fato de ser contaminado no coito, consegue eliminar os elementos indesejáveis em algumas horas. Após a monta/IA é necessário que o ambiente uterino esteja apto para receber o embrião em torno dos 5,5 dias de prenhez (CAMOZZATO, 2010). A presença de fluidos devido uma reação inflamatória exacerbada e persistente ou a existência de fibrose periglandular fazem do ambiente uterino um local inapropriado para o desenvolvimento do embrião e diminui conseqüentemente a fertilidade da égua.

A falha na concepção de éguas tem sido assunto de grande interesse devido ao aumento do mercado de biotecnologias ligadas a reprodução como transferência de embriões, injeção intracitoplasmática e criopreservação de sêmen e embriões na espécie equina. A endometrite é considerada atualmente uma das principais causas de redução da fertilidade em éguas e pode ser dividida devido sua etiologia e patogenia em 4 diferentes tipos: endometrite persistente pós cobertura, endometrite sexualmente transmissível, infecciosa crônica e degenerativa crônica ou endometrose (TROEDSSON, 1999).

Com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva, diversos tratamentos e procedimentos têm sido realizados. No entanto, éguas denominadas suscetíveis não respondem adequadamente aos tratamentos convencionais e não conseguem combater a infecção de forma eficiente, a qual torna-se persistente, subclínica ou crônica (MAMBELLI *et al.*, 2013). Nestas éguas com exacerbção do processo inflamatório se estabelece um alto grau de fibrose periglandular levando a uma queda drástica da fertilidade da fêmea (KENNEY; DOIG, 1986).

O uso de terapias biológicas como células tronco e plasma rico em plaquetas (PRP) em cavalos foi introduzido no tratamento de afecções do aparelho locomotor. Atualmente, estuda-se o uso dessas terapias para tratar problemas uterinos por serem capazes de estimular a

regeneração tecidual e diminuir a inflamação aumentando as citocinas anti-inflamatórias e reduzindo a concentração das pró-inflamatórias.

## 2 MORFOLOGIA UTERINA NA ÉGUA

O útero na espécie equina é composto por dois cornos uterinos e um corpo. A parede desse órgão é formada por três camadas distintas: o endométrio, o miométrio e o perimétrio.

O endométrio consiste em duas camadas: o epitélio, o qual têm células que variam entre cuboidais e cilíndricas durante o ciclo estral, e a lâmina própria onde se encontram glândulas tubulares. A lâmina própria é dividida segundo Kenney (1978) em estrato compacto (formado por células do estroma, fibras reticulares e numerosos capilares) e estrato esponjoso (porção mais vascularizada, fibrosa, com baixa densidade de células onde estão as glândulas endometriais). Os vasos no estrato esponjoso são capilares, arteríolas, vênulas e vasos linfáticos (KENNEY, 1978).

O miométrio possui duas camadas musculares lisas. A camada interna é mais grossa e possui fibras no sentido circular, enquanto a camada externa tem direção longitudinal e menor espessura. O perimétrio reveste o órgão como peritônio visceral, juntando-se a duas camadas de mesométrio as quais sustentam o órgão na cavidade pélvica.

### 3 ENDOMETROSE

A endometrose é um processo degenerativo e crônico do endométrio. (RICKETTS, 1975). Hoffmann *et al.* (2008) definiram a doença como a atividade alterada ou inatividade das glândulas do endométrio, podendo ser caracterizada por um processo progressivo e irreversível, correlacionado com a idade do animal, que leva à degeneração do tecido endometrial e à formação de tecido fibroso periglandular que pode afetar glândulas isoladas ou ninhos glandulares.

A etiologia e patogenia da endometrose permanecem pouco conhecidas (HOFFMANN *et al.*, 2003). Porém, sabe-se que feixes periglandulares de colágeno e camadas de tecido fibroso caracterizam o início da doença (RAILA *et al.*, 1997). O colágeno é produzido por grandes células estromais que, em um estágio mais avançado se diferenciam em miofibroblasto. Os miofibroblastos secretam mediadores que afetam a composição da matriz extracelular e promovem a contratilidade das glândulas uterinas, prejudicando a função destas (HOFFMANN *et al.*, 2008).

A melhor forma de diagnosticar e determinar o grau da endometrose é com a realização de biópsia uterina. O grau de endometrose é determinado pela frequência de glândulas com fibrose e formação de ninhos (discreto  $\leq 2$ /campo; moderado = 2-4/campo; severo  $\geq 4$ /campo) além do número de camadas de fibrose (discreto = 1-3; moderado = 4-10; severo  $\geq 10$  camadas) (KENNEY; DOIG, 1986). Quando tem-se a presença de fibrose periglandular difusa, independente do grau de severidade, o efeito nocivo causado na capacidade do útero em levar uma gestação a termo é maior quando comparada a alterações localizadas. Isso faz com que a frequência de aparecimento de ninhos de fibrose seja um fator importante para a classificação do grau de endometrose (KENNEY, 1978)

Schoon *et al.* (1995) analisaram biópsias de 585 éguas com idades entre 3 e 27 anos em rotina de diagnóstico laboratorial. 61% das éguas apresentaram endometrose, sendo que, destas, 66% de grau leve, 30% de grau médio e 4% de grau severo. 32,6% das éguas com endometrose apresentaram endometrite concomitante. Já Flores *et al.* (1995) encontraram 5% de endometrite concomitante em éguas com grau leve de endometrose, enquanto que em éguas com grau médio a severo, o valor subiu para 30%.

A idade tem forte relação com a presença de endometriose em éguas segundo Schoon *et al.* (1995). 30% das éguas com menos de 9 anos de idade apresentaram endometriose, nenhuma delas de grau severo; em éguas com idade entre 9 e 14 anos, 60% apresentaram endometriose, enquanto esse valor aumenta para 90% em éguas com mais de 14 anos. Com o mesmo trabalho, os autores correlacionaram o grau de endometriose e o sucesso da gestação. Enquanto 45% das éguas com grau leve de endometriose levaram a gestação a termo, 32% tiveram sucesso dentre as éguas com grau médio, e 0% com grau severo.

O tempo em que as éguas ficaram vazias também teve forte correlação com o grau de endometriose (SCHOON *et al.*, 1995). 72,6% das éguas vazias há 1 ano e 95,4% das vazias há mais de 2 anos apresentaram endometriose; das éguas com histórico de potros nascidos, apenas 32% apresentaram a doença.

Como a endometriose é um processo progressivo e irreversível, muitos tratamentos já foram propostos, porém nenhum deles obteve sucesso na redução do processo fibrótico ou na melhoria da fertilidade (HOFFMANN *et al.*, 2008). Alguns autores descrevem reversão parcial da fibrose periglandular após curetagem do endométrio (RICKETTS, 1985), uso de infusão de querosene (ROBERTS, 1993) e de dimetil sulfoxido (DMSO) (LEY *et al.*, 1989).

## 4 ENDOMETRITE

A endometrite é o estado inflamatório do endométrio (KELLER, 2004). Esta situação pode ocorrer associada a uma infecção bacteriana ou não (EQUINE...,1993). Segundo LeBlanc (2010), a endometrite na égua pode ser dividida em infecção aguda, infecção crônica ou endometrite persistente pós cobertura.

Durante a endometrite aguda e subaguda, a produção de muco pelas células epiteliais que revestem o endométrio é aumentada (LEBLANC *et al.*, 2007; CAUSEY *et al.*, 2007). Mudanças na produção e viscosidade desse muco endometrial podem interferir na habilidade do útero de remover partículas. (LEBLANC, 2010)

A rápida limpeza física do útero é fundamental para a fertilidade. Éguas que são incapacitadas de depurar os produtos da inseminação ou do parto podem desenvolver endometrite pós cobertura ou uma inflamação aguda. Caso a endometrite não seja rapidamente resolvida, a infecção pode cronificar (LEBLANC, 2010).

Com a monta ou inseminação artificial, o sêmen é depositado dentro do lúmen uterino, o que inicia uma resposta inflamatória transitória e fisiológica no endométrio pela presença de espermatozoides, bactérias e proteínas do plasma seminal. Em éguas resistentes acontece a ativação de mecanismos de defesa a fim de eliminar o agente causador da inflamação em até 96 horas (LEBLANC *et al.*, 1994) para que o embrião possa chegar ao lúmen uterino no quinto ou sexto dia após a fertilização e encontrar um ambiente propício para seu desenvolvimento.

A presença de fluido, bactérias e produtos inflamatórios prejudica o transporte espermático e a fertilização (REILAS, 2001), e pode tornar o ambiente uterino incompatível com a sobrevivência do embrião (WAITES; BELL, 1982). Caso a inflamação persista, pode resultar em uma luteólise prematura e consequente perda embrionária devido a concentrações aumentadas de prostaglandina (NEELY *et al.*, 1979).

### 4.1 Endometrite Persistente Pós Cobertura

A endometrite persistente pós cobertura é uma condição inflamatória não infecciosa que afeta o útero de éguas de todas as raças (TROEDSSON *et al.*, 2001). É resultante da ineficiência

dos mecanismos de defesa uterina em eliminar antígenos e produtos inflamatórios e é atualmente a maior causa de redução da fertilidade em éguas (TROEDSSON, 2011).

A cascata inflamatória começa com o reconhecimento de patógenos, seguido pelo recrutamento de células inflamatórias e termina com a resolução do processo inflamatório. Durante esse processo, mediadores pró inflamatórios são liberados desencadeando vasodilatação, exsudação de plasma, migração de leucócitos e destruição local do tecido (PARHAM, 2009). Citocinas anti-inflamatórias ou imunomoduladoras inibem a ação das citocinas pró inflamatórias inibindo o processo inflamatório e prevenindo a destruição do tecido local. Éguas suscetíveis a EPPC têm aumento significativo dos níveis endometriais de IL-1b, IL-6, TNFa e IL-8 (citocinas pró inflamatórias) e redução significativa de mRNA de IL-10 (anti-inflamatória) durante o estro e o diestro quando comparadas a éguas normais (Fumuso *et al.*, 2006). Segundo Ferris *et al.* (2014), isso sugere que éguas susceptíveis tem uma alteração na condição inflamatória no útero depois de cada cobertura ou IA.

Em estudo recente, Woodward *et al.* (2013) comparou éguas suscetíveis e resistentes a EPPC e encontrou reduzidas concentrações de IL-1Ra, IL-10 e IL-6 em éguas suscetíveis após 6 horas após contato com o espermatozoide. O pico de inflamação foi similar entre os dois grupos de éguas, o que sugere que éguas susceptíveis tem uma evidente resposta inflamatória ao espermatozoide mas incapaz de parar o processo inflamatório uma vez ativado. Segundo os autores, 6 horas após a inseminação foi o tempo crítico onde a EPPC se desenvolveu e é o período ideal que os tratamentos devem ser aplicados para diminuir a inflamação.

## 5 MECANISMOS DE DEFESA DO ÚTERO

### 5.1 Barreiras físicas

O útero é protegido de agentes contaminantes externos por quatro barreiras físicas: a vulva, o vestíbulo, a vagina e a cérvice (TROEDSSON, 2011). Defeitos ou alterações na conformação dessas barreiras podem predispor a égua à endometrite.

Caslick (1937) estudou a importância da conformação vulvar em infecções do trato genital e subsequente infertilidade na égua. Em seu trabalho foi concluído que ângulos de 80 graus em relação ao eixo horizontal são desejáveis, enquanto que ângulos menores que 50 graus são mais propensos à pneumovagina e consequentes problemas clínicos. Outros problemas nas barreiras anatômicas também podem contribuir para a instalação de endometrites como urovagina e dilacerações ou aderências de cérvice (KATILA, 1996).

Na espécie equina a ejaculação é intrauterina. Com isso, todas as barreiras físicas que protegem o útero são ultrapassadas e espermatozoide, plasma seminal e bactérias do trato reprodutor masculino entram em contato com o endométrio e induzem uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997).

### 5.2 Limpeza física uterina

A drenagem mecânica é uma das principais formas de limpeza do útero após a cobertura. A contração do miométrio é o mecanismo responsável pela drenagem de conteúdo tanto via cérvice quanto via sistema linfático (TROEDSSON, 1999). Veias linfáticas drenam o excesso de líquido da submucosa e do lúmen uterino. Com a contração miometrial, os vasos linfáticos são comprimidos e a linfa se move em direção aos linfonodos (GUYTON, 1991). No estro, tem-se períodos de contratilidade de aproximadamente 5 minutos, alternados com períodos de repouso (WIDDERS, 1985). Durante o diestro, enquanto a cérvice está fechada, provavelmente os vasos linfáticos absorvem fluidos e partículas remanescentes no útero (LEBLANC *et al.*, 1995).

Em éguas suscetíveis à endometrite, percebe-se uma atividade miometrial reduzida em resposta a inflamação (TROEDSSON, 1993). Essa redução acontece tanto na frequência, quanto na duração e intensidade do movimento muscular (TROEDSSON, 1999). Evans *et al.*

concluíram que microesferas cobertas por material radioativo foram eliminadas mais rapidamente do útero de éguas jovens e nulíparas comparando com éguas velhas e múltiparas. Em estudos posteriores, éguas resistentes limpam o útero com microesferas em 24 horas após a inoculação enquanto éguas suscetíveis demoraram 96 horas.

A fim de estudar a limpeza por via do sistema linfático, Le Blanc *et al.* (1995) infundiram nanquim no útero de éguas resistentes e suscetíveis a endometrite durante o diestro e verificaram uma drenagem linfática mais lenta em éguas suscetíveis. A demora na limpeza de subprodutos da inflamação permite a aderência de bactérias ao endométrio, agravando o quadro (LEBLANC *et al.*, 1994).

Deficiências na limpeza física do útero podem ser resultado da contratilidade uterina deficiente, obstrução por falha no relaxamento cervical ou por mudanças conformacionais, como útero pendular, que fazem com que a remoção do conteúdo uterino seja mais difícil (BRISKO *et al.*, 2011). Éguas com coleção de líquido intrauterino muitas vezes apresentam cérvix anormal, sendo o funcionamento desta, um ponto crítico na drenagem uterina (EQUINE..., 1993).

### **5.3 Mecanismos imunológicos e celulares**

#### **5.3.1 Imunidade humoral**

Diferentes classes de imunoglobulinas já foram isoladas do útero equino como IgG (IgGa, IgGb, IgG c), IgT, IgA e IgM. Segundo Widders *et al.* (1985), o transporte de imunoglobulinas para o útero é mínimo e por ter potencial para síntese local, é considerado parte do sistema imune mucóide. Isso foi comprovado com o fato de haver maior concentração de imunoglobulinas nas secreções uterinas do que no plasma de éguas saudáveis. Estudos utilizando imunohistoquímica do endométrio concluíram que a concentração de imunoglobulinas permanece constante durante o ciclo estral (WAECHLI; WINDER, 1987).

Apesar de serem componentes essenciais do sistema imunológico, quando Waelchi *et al.* (1987) compararam secreções uterinas de éguas suscetíveis e resistentes, as primeiras tiveram maiores concentrações de anticorpos, (WAECHLI; WINDER, 1991) o que mostra que uma deficiência na resposta humoral não contribui significativamente para o aumento na suscetibilidade à endometrite (LYLE, 2011).

### 5.3.2 Imunidade celular

Após a inseminação ou monta e o contato do endométrio com espermatozoides e proteínas do plasma seminal, a primeira resposta da imunidade celular é a migração de neutrófilos para o lúmen uterino. Uma hora após a IA já encontramos os primeiros leucócitos no útero de éguas resistentes (KATILA, 1995). O útero responde rapidamente a um antígeno com o aumento de mediadores quimioatrativos de neutrófilos, como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), prostaglandina E (PGE) e prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ ), resultando em uma rápida migração dessas células para o lúmen uterino (PICOCK *et al.*, 1990). O maior número de polimorfonucleares é encontrado ao redor de 6 a 12 horas após a IA ou inoculação de bactérias (KATILA, 1995; KATILA, 1990). Esse pico de neutrófilos não diferiu entre éguas suscetíveis e resistentes, (LIU *et al.*, 1986) porém, nas primeiras essas células continuaram em altos níveis por um período de tempo maior enquanto que nas segundas, diminuíram gradualmente e, 48 horas após a IA não foram mais encontradas (KATILA, 1995).

Segundo Liu *et al.* (1985), polimorfonucleares provenientes de secreções uterinas de éguas suscetíveis tem menor capacidade de migração e fagocitose. Essa deficiência na fagocitose seria resultado da menor concentração de opsoninas da secreção uterina de éguas suscetíveis quando comparadas a de éguas resistentes (TROEDSSON *et al.*, 1993).

## 6 CÉLULAS TRONCO

As células tronco são células com alta capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversas linhagens celulares. Possuem alto potencial terapêutico pela habilidade de regular a inflamação, promover a regeneração tecidual e prevenir a formação de cicatrizes (BORJESSON; PERONI, 2011). São classificadas em embrionárias (CTE), retiradas da massa celular interna de embriões em fases iniciais, e somáticas ou adultas (CTA), provenientes de tecidos diferenciados de fetos, recém nascidos ou adultos (LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2012).

As células provenientes do embrião são originadas a partir de uma das três camadas germinativas e possuem a habilidade de se diferenciar em qualquer tipo de tecido. Essas células tronco têm alto potencial para ser fonte provedora, *in vitro*, de muitos tipos de células para posterior utilização em terapia celular (LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2012).

As CTA têm o papel de reparação tecidual e estão presentes na pele, no fígado, coração, cérebro, medula óssea, sangue do cordão umbilical e placenta. Além da substituição das células que sofrem apoptose, esse tipo de células tronco pode proporcionar a recuperação fisiológica de lesões resultantes de acidentes ou causadas por um patógeno (LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2012). Ainda, implicam em menos problemas éticos para a pesquisa e aplicação clínica quando comparadas às CTE, pois não fazem uso de embriões como material biológico.

O uso das CTA no desenvolvimento de pesquisas e na medicina regenerativa é importante e tem vantagens, uma vez que sua diferenciação é mais controlada e, quando introduzidas no organismo, dificilmente produzem tumores (MARTIN, 2008). Quando estudadas inicialmente, acreditava-se que essas células eram capazes de se diferenciarem apenas em células derivadas da mesoderme (demonstrado em CT mesenquimais, CTM). Atualmente, acredita-se em uma maior plasticidade das CTA, podendo gerar células derivadas também da endoderme e da ectoderme (MAMBELLI *et al.*, 2013).

### 6.1 Células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais são CTA e são definidas por um conjunto de características *in vitro* como combinação de marcadores fenotípicos e as propriedades funcionais de diferenciação (MAMBELLI *et al.*, 2013). A origem embrionária das células tronco

mesenquimais (CTM) é o mesoderma, o qual da origem a tecidos conectivos como o ósseo, cartilaginoso, adiposo além do sistema vascular e hematopoiético (HUMPHREYS; BONVENTRE, 2008).

Chen *et al.* (2008) evidenciam a habilidade de migração seletiva dessas células para áreas lesionadas, inflamadas ou com tumores. Nesses locais as CTM têm papel de reparação tecidual e formação do estroma associado à lesão. Essas características fazem com que essas células possam ser utilizadas como veículos em terapias de locais específicos.

As CTM estão presentes em muitos tecidos, sendo a medula óssea um dos mais ricos. São encontradas em menores quantidades no sangue periférico, sangue do cordão umbilical e da placenta, músculo esquelético, derme e tecido adiposo. Segundo Landim-Alvarenga *et al.* (2012), este comportamento sugere que essas células surgem na medula óssea mas circulam pelos órgãos e tecidos quando necessitam de reparação. Este processo ocorre fisiologicamente e é regulado por interações de citocinas depois que células da medula óssea são recrutadas. Takahashi *et al.* (2007) afirmam que a variedade de quimiosinas secretadas pelos tecidos adjacentes podem induzir a diferenciação em diferentes linhagens celulares e/ou influir no lugar específico em que se encontram.

A quantidade de CTM existentes durante a vida adulta influenciam a regeneração do tecido mesenquimal BRO. Segundo Chen *et al.* (2008) as CTM secretam diferentes citocinas e quimiosinas como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), fator de crescimento insulínico (IGF-1), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator derivado do estroma-1, angiopoietina-1, proteína inflamatória-1 alfa e beta de macrófagos e eritropoietina em quantidades maiores que os fibroblastos da pele. Além disso, a secreção desses fatores pelas CTM recruta macrófagos e células da linhagem endotelial, melhorando a cicatrização de feridas.

Para a identificação das células tronco, a plasticidade destas é de suma importância. Por esse conceito, uma célula tronco de uma linhagem particular consegue se diferenciar em uma linhagem de células completamente diferente, tornando ambígua a identificação de células de determinada linhagem embrionária. Marcadores de superfície que reflitam as características biológicas e funcionais das células em geral está sendo usados para identificar as mesmas. As CTM apresentam diversos marcadores imuno-fenotípicos, mas esses marcadores não são específicos como os de outros tipos celulares (LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2012). Segundo

Taylor *et al.* (2007), a maioria dos marcadores utilizados para a caracterização de CTM não foram desenvolvidos especificamente para a espécie equina e já existem provas que alguns marcadores disponíveis para outras espécies não reagem de forma cruzada para CTM equinas.

## 6.2 Mecanismos de terapia

### 6.2.1 Migração

Migração é um processo que ocorre quando células, como os leucócitos, se locomovem para tecidos periféricos como tecidos linfóides secundários ou zonas de inflamação. O mecanismo molecular que ocorre na migração leucocitária é um processo complexo e necessário para que essas células escapem de forças de cisalhamento geradas no vaso sanguíneo e representa um paradigma no *homing* de CTM.

*Homing* é o processo pelo qual células migram e enxertam-se em um tecido onde irão exercer efeitos funcionais. Bensidhoum *et al.* (2004) injetaram CTM via endovenosa em camundongos sem alterações fisiológicas e notou que as CTM “preferiram” se fixar na medula óssea. Porém, quando algum sítio de inflamação estava presente nos animais, as CTM apareceram preferencialmente nesses locais. O mecanismo molecular que diferencia o local de destino das CTM dependente da presença ou não de inflamação não é completamente elucidado. (BROOKE *et al.*, 2007).

Os primeiros eventos da migração compreendem o rolamento e aderência sobre o endotélio da medula óssea devido interações entre E- e P-selectina expressadas pelas células do endotélio da medula óssea e de tecidos inflamados. Após, ocorre a fixação e adesão ao endotélio em dois passos. Primeiramente receptores de quimiosinas ligam-se às quimiosinas presentes na superfície do endotélio e após, integrinas são ativadas, como a VLA-4 a qual une os ligantes provocando uma firme adesão. Depois de aderida, a célula começa uma série de interações que resultam na diapedese através das células do endotélio. A direção da migração é sustentada pelo gradiente de densidade de quimiosinas. (BROOKE *et al.*, 2007).

### 6.2.2 Imunossupressão

As células tronco mesenquimais possuem propriedades imunossupressoras ainda não compreendidas inteiramente, porém estudos recentes sugerem um mecanismo de supressão de células T. Além disso, as CTM têm uma grande vantagem em relação a outros tipos de terapia celular por serem imunologicamente privilegiadas e conseguirem ultrapassar barreiras MHC sem precisar de imunossupressão. (BROOKE *et al.*, 2007).

Segundo Souza *et al.* (2010), na presença de células tronco mesenquimais, as células dendríticas diminuem a expressão de moléculas de superfície como MCH II, CD11c e CD83 e diminuem também a secreção de IL-12. Essas supressões prejudicam a apresentação de antígenos dessas células. Esses autores também relatam a inibição de células T causando diminuição da produção de INF-  $\gamma$  e aumento da produção de IL-4. Com isso ocorre uma alteração do perfil da resposta imune de pró-inflamatória para anti-inflamatória.

### 6.2.3 Regeneração e reparo tecidual

Segundo Brooke *et al.* (2007), as CTM possuem plasticidade além da sua linhagem mesodérmica, e podem gerar pelo menos *in vitro*, tecidos do ectoderma e do endoderma. Além dessas características, a facilidade de isolamento além da sua capacidade de ser modificada usando técnicas de engenharia molecular fazem dessas células ótimas candidatas quando precisasse de reparação e regeneração de uma variedade de tecidos.

Segundo Frisbie *et al.* (2012), as CTM são longamente utilizadas em equinos para diminuir a inflamação e para o tratamento de lesões tendíneas e ligamentares.

## 6.3 Células tronco no tratamento de endometrite persistente pós cobertura

A pesquisa para a utilização de células tronco em afecções uterinas de equinos como a EPPC é muito recente. Ferris *et al.* (2014) salientam o potencial das CTM hipotetizando a secreção de uma série de moléculas bioativas imunomoduladoras como PGE<sub>2</sub>, IL-10, IL-1Ra, entre outros. Outro fator que levou o início dos estudos é o fato dessa terapia celular já ser muito utilizada em afecções do sistema locomotor em equinos promovendo a redução da inflamação e tratando osteoartrites (FRISBIE; SMITH, 2011).

Éguas suscetíveis e resistentes a EPPC têm a pico de inflamação muito similar. Essa resposta inflamatória inicial é importante para limpeza do útero de espermatozoides, debris e bactérias que entraram no ambiente uterino no momento da reprodução. Woodward *et al.* (2013) concordam que a primeira diferença notada entre as duas classes de éguas é a diminuição de citocinas imunomoduladoras (IL-1Ra e IL-10) em éguas suscetíveis em 6 horas após a exposição a espermatozoides. No mesmo estudo, éguas resistentes não tiveram aumento de células inflamatórias no endométrio enquanto éguas suscetíveis tiveram esse aumento duas a 12 horas após IA. A diferença nas primeiras 2 a 6 horas, é que éguas suscetíveis continuam a ter uma diminuição de níveis de IL-1Ra e um influxo contínuo de células inflamatórias para o endométrio.

Ferris *et al.* (2014) utilizaram éguas sadias como modelo experimental para comparar éguas tratadas com infusão de placebo com éguas tratadas com infusão de Ringer Lactato contendo CTM 24 horas antes da IA. Quando analisados os resultados dos lavados uterinos com baixo volume, detectaram que as éguas tratadas com CTM tiveram uma redução significativa no número de neutrófilos/mL de lavado quando comparadas com as éguas tratadas com placebo. Analisaram também a concentração de IL-1Ra, a qual foi significativamente maior nas éguas tratadas com a terapia celular na hora da IA e teve tendência ao aumento 6 horas após a infusão de espermatozoides mortos. Com esses resultados os autores concluíram que as CTM têm alto potencial para tratar a EPPC pela habilidade de diminuir o influxo de neutrófilos e aumentar a concentração de citocinas anti-inflamatórias após evento inflamatório.

#### **6.4 Células tronco no tratamento da endometriose**

A endometriose ou endometrite crônica degenerativa também é forte candidata ao tratamento com CTM. Por ter habilidade de reparação tecidual, essas células têm alto potencial terapêutico nessa patologia. Mambelli *et al.* (2011) tratou seis éguas com endometriose com infusão de células tronco e comparou com tratamento placebo. Primeiramente foi analisada a capacidade das células tronco em enxertar-se em tecido uterino, sendo positivo em cinco das seis éguas. A análise foi feita pela presença de células tronco marcadas com *Vybrant* em lâminas de histologia das biópsias uterinas de corno e corpo uterino. A autora sugere que as células tronco não estavam presentes nas biópsias da sexta égua pois essa apresentava um grau muito avançado

de fibrose impossibilitando a sobrevivência e divisão celular. Sobre esse caso, conclui que determinados graus de fibrose não respondem ao tratamento proposto.

Quando avaliadas as biópsias uterinas, constatou-se que ocorreu melhora significativa quando comparadas amostras após a infusão de células tronco com amostras anteriores. A melhora foi a nível de organização tecidual e morfologia das glândulas uterinas sete dias após a infusão e foi confirmada com amostras nos dias 21 e 61. Em animais controles não foram observadas melhoras.

Pavão (2013) utilizou 10 éguas com grau severo de fibrose nas quais injetou  $2 \times 10^7$  células tronco mesenquimais com o auxílio de endoscópio flexível e agulha e avaliou biópsias uterinas na hora 0, 15, 30 e 60. A representação do número médio de ninhos glandulares avaliados ao longo do tempo demonstrou decréscimo significativo ao longo do tratamento com célula tronco. Em relação a classificação do infiltrado inflamatório pela presença de neutrófilos no estrato compacto a autora observou mudança significativa nas amostras entre os momentos do tratamento. A densidade e a atividade glandular foram verificadas durante o tratamento, assim como a diminuição do número de ninhos glandulares. A autora justifica essas melhoras em função da ação de fatores quimiotáticos que modulam o processo inflamatório e pelo aumento da vascularização local do tecido pois as lesões fibróticas localizam-se principalmente ao redor de estruturas glandulares com conseqüente comprometimento de sua função levando redução do crescimento fetal e alterações das secreções endometriais que influenciam a performance reprodutiva da égua. Quando avaliada a área de fibrose endometrial, observou-se diminuição de 70,98% entre as horas 0 e 60.

Pavão (2013) avaliou alteração na quantidade de colágeno, sendo que não houve alteração na quantidade de colágeno tipo 1 e observou-se diminuição significativa de marcação de colágeno tipo III entre a hora 0 e 60. Nos processos fibróticos ocorre a substituição dos depósitos de ácido hialurônico e fibronectina por colágeno tipo I e III e é a deposição desses dois tipos de colágenos com estrutura rígida que promove o desenvolvimento do tecido cicatricial com maior força tensora (BOCHSLER; SLAUSON, 2002).

Muitos estudos comprovam que a utilização de células tronco reduz significativamente a fibrose em diversos órgãos como fígado e coração (ORLIC *et al.*, 2001) em roedores. Além disso, é sabido que as células tronco mesenquimais participam do processo de crescimento,

remodelação e cicatrização tecidual, implantando-se e causando um aumento do número de células progenitoras e o potencial tecidual de regeneração (RICHARDSON, 2005).

Ding *et al.* (2014) utilizaram ratos como modelo experimental e concluíram que células tronco mesenquimais melhoram o endométrio severamente danificado por regeneração tecidual e secreção de fatores de crescimento que induzem proliferação, migração de células endometriais locais promovendo angiogênese.

## 7 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

A primeira descrição de desenvolvimento e uso de plasma rico em plaquetas (PRP) foi no início de 1990 e desde então a sigla tem sido descrita como “um volume de plasma que tem uma contagem de plaquetas superior ao patamar fisiológico”. Essa definição sugere uma mistura pura de plasma e plaquetas, porém, o termo genérico PRP recentemente expandiu para incluir uma variedade de produtos finais. Para delinear mais precisamente esses produtos com base no seu teor de leucócitos e fibrina, a comunidade científica abriu um leque de nomes como PRP puro, PRP rico em leucócitos, fibrina pura rica em plaquetas e fibrina rica em plaquetas e leucócitos. Os termos “rico em plaquetas” e “concentrado de plaquetas” também são utilizados para PRP (ZHU *et al.*, 2013).

O plasma rico em plaquetas é obtido após centrifugação suave de sangue total. O sobrenadante resultante desse processo contém uma elevada concentração de plaquetas e de 7 proteínas fundamentais secretadas por estas para promover a cicatrização de feridas incluindo fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) alfa, beta e alfa/beta, fatores de crescimento transformante (TGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF). O componente plasmático do sobrenadante centrifugado contém 3 importantes proteínas para a regeneração tecidual: fibrina, fibronectina e vitronectina. A fibrina polimeriza e liga-se com a fibronectina formando um substrato apropriado para o desenvolvimento de um novo tecido. A vitronectina coordena a migração celular através da proteólise e adesão celular. (MAUTER; KNEER, 2014).

O PRP é uma fonte autógena de fácil aquisição e baixo custo de diversos fatores de crescimento importantes na reparação tecidual com ação mitogênica, quimiotática e neovascular. Para ser eficiente, deve conter entre três e cinco vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos. (REGHINI, 2013).

Quando iniciou-se a técnica o PRP era obtido por máquinas de plasmaférese e era utilizada trombina bovina para sua ativação. Após, surgiram kits os quais tornaram simples a obtenção do PRP, porém com custo elevado. Atualmente, diversos protocolos com o uso de centrífugas comuns vêm sendo empregados. Ventruscolo *et al.* (2012) testaram diversos protocolos da literatura para obtenção de PRP da literatura e concluíram que o protocolo de Carmona *et al.* (2007) foi o mais eficiente em concentrar plaquetas de equinos. Protocolos onde a

força de centrifugação era muito alta não resultaram em altas concentrações plaquetárias, segundo Reghini (2013) por ativar ou lesar plaquetas levando à formação de pellets compostos por plaquetas e leucócitos que não se desfaziam facilmente. Nos protocolos com menor força os leucócitos e plaquetas depositados no fundo do tubo soltaram-se facilmente.

Reghini *et al.* (2013) evidenciam a importância das plaquetas na resolução da inflamação de acordo com as lipoxinas. Essas, são moléculas que modulam o processo inflamatório pois diminuem a quimioatração de neutrófilos para o local lesado, promovem sua apoptose, além de apresentar quimiotaxia por monócitos os quais se transformarão em macrófagos no tecido e realizarão a cicatrização e resolução da inflamação. Uma das principais rotas da biossíntese da lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) é a interação dos neutrófilos com as plaquetas, o que torna o PRP importante ferramenta para o tratamento de endometrite onde a reação inflamatória exacerbada é o problema.

El-Sharkawy *et al.* (2007) demonstraram que além de o PRP aumentar a distribuição dos fatores de crescimento para áreas lesionadas, aumenta também os níveis de LXA<sub>4</sub> e de RANTES (regulador da ativação de células T normais), quimosinas secretadas por macrófagos e células endoteliais que também mantêm o gradiente quimiotático para a migração dos leucócitos. Além disso, pelos RANTES inibirem a liberação de histamina pelos basófilos acabam levando à inibição do processo inflamatório em geral (REGHINI, 2013).

Woodall *et al.* (2008) analisaram a atuação das plaquetas na liberação de IL-1 pelos macrófagos e concluíram que essas causam uma supressão inicial de IL-1 a qual posteriormente é liberada gradualmente durante 7 dias, indicando que o PRP pode ser usado como um agente anti-inflamatório transitório.

### **7.1 Plasma rico em plaquetas no tratamento da endometrite persistente pós cobertura**

O PRP foi inicialmente utilizado no tratamento de enfermidades de equinos no aparelho locomotor. Arguelles *et al.* (2008) observaram notável melhora clínica em desmopatias e tendinopatias agudas e crônicas após a injeção de concentrados de plaquetas no local lesionado. Em outro estudo do mesmo autor em 2005, foi aplicado PRP na lesão de sete equinos com tendinite ou desmíte e foi observada redução na severidade da claudicação e melhora na imagem ultrassonográfica das estruturas envolvidas. Os animais voltaram às atividades físicas antes

praticadas após dois meses de tratamento. Esses trabalhos elucidam o potencial terapêutico do PRP em reduzir processos inflamatórios, como acontece na endometrite.

Reghini (2013) utilizou 23 éguas onde 15 eram susceptíveis e 8 resistentes. Analisou a inflamação através do número de polimorfonucleares (PMNs) no fluido uterino e na citologia uterina, e também pela quantidade de fluido uterino e pela concentração de óxido nítrico. Obteve como resultados a diminuição da quantidade de fluido acumulado no interior do útero, o que mostra o potencial efeito benéfico do PRP. O percentual de neutrófilos foi diminuído em éguas susceptíveis após o tratamento com PRP a níveis considerados aceitáveis após 24 horas de contato com o sêmen.

Segundo Metcalf (2014), os grânulos alfas das plaquetas secretam moléculas bioativas com capacidade de regeneração sob a forma de fatores de crescimento, citocinas e quimiosinas. Em outro trabalho do mesmo autor (METCALF *et al.*, 2012) éguas susceptíveis tratadas com infusão intrauterina de PRP tiveram uma diminuição na expressão de citocinas endometriais pró-inflamatórias como IL-1b, IL-6 e IL-8 após deposição de sêmen em comparação com grupo controle. Já no trabalho de 2014, o autor objetivou determinar o efeito do PRP na taxa de prenhez e a EPPC em éguas susceptíveis. Em seus resultados, constatou que as éguas tratadas com PRP tiveram taxa de prenhez significativamente maior (67%) quando comparadas com éguas não tratadas (19%) enquanto que a retenção de fluido intraluminal foi menor, 22% nas tratadas e 100% no grupo controle.

## 8 PLASMA AUTÓLOGO ACRESCIDO DE LEUCÓCITOS

Castilho (1994) desenvolveu um tratamento para endometrites utilizando plasma autólogo acrescido de neutrófilos. Depois de testar vários protocolos para estabeleceu como melhor método de separação de neutrófilos a utilização de gradiente osmótico com solução de dextrose a 6%. Utilizou provas de fagocitose em placa para observar a capacidade fagocítica e coloração de Azul Trypan (TBS) para a viabilidade das células separadas por esse método, a qual foi de 92,6%. Após, Castilho *et al.* (1997) confirmaram esses resultados utilizando citometria de fluxo para testar novamente a viabilidade e capacidade fagocítica das células separadas do sangue total utilizando dextrose 6%. O tempo de sobrevivência dos leucócitos após infundidos no útero e recuperados através de lavagem foi, em média, 6 horas.

Mattos *et al.* (1999a) infectaram éguas com *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* e trataram com lavagem uterina com solução salina, lavagem uterina e infusão de plasma homólogo, e lavagem uterina com solução salina e infusão de plasma homólogo com leucócitos. Os autores acharam em seus resultados que éguas tratadas com plasma contendo leucócitos eliminaram a bactéria dois dias antes comparadas a éguas tratadas com os outros protocolos. O sucesso do tratamento com leucócitos se deve, segundo os autores, ao efeito sinérgico dos três componentes. Primeiramente, a lavagem uterina limpa o endométrio e remove produtos inflamatórios acumulados e material contaminado. Após, o plasma homólogo acrescenta fatores opsonizantes ao lúmen uterino e os neutrófilos provenientes do sangue promovem uma fagocitose eficiente, o que não é encontrado em neutrófilos presentes no lúmen uterino de éguas suscetíveis.

Em outro trabalho de mesmo ano, Mattos *et al.* (1999b) compararam o efeito da ocitocina, da lavagem uterina seguida de infusão de plasma acrescido de leucócitos, da junção dos dois tratamentos e do maleato de metilergonovina em éguas susceptíveis a endometrite. As éguas tratadas com lavagem uterina seguida de infusão de plasma acrescido de leucócitos com ou sem aplicação de ocitocina eliminaram a bactéria significativamente mais rápido que os outros tratamentos. O uso de dextrose 6% para a separação de leucócitos pode ter sido responsável pela migração de plaquetas para a porção plasmática. Os autores enfatizam que a presença de plaquetas no plasma infundido pode ter aumentado a habilidade fagocítica dos neutrófilos e inibido a apoptose leucocitária.

Em trabalho realizado com 394 éguas divididas em virgens, vazias e com potro ao pé, Mattos *et al.* (1997) compararam a utilização de plasma com leucócitos, plasma homólogo e plasmas homólogo associado à antibioticoterapia como tratamento pós cobertura. As maiores taxas de prenhez foram encontradas no grupo onde se utilizou plasma acrescido de leucócitos em éguas vazias.

Castilho *et al.*, em 1997, propuseram a utilização de leucócitos criopreservados para tornar o tratamento mais prático para seu uso a campo. Estabeleceram a técnica de congelamento e testaram os leucócitos após o descongelamento.

O plasma homólogo acrescido de leucócitos também foi usado para tratamento de afecções do aparelho locomotor. Garrett *et al.* (2013) compararam-no com solução salina para o tratamento de sesamoidites e desmites de cavalos de corrida jovens. Os cavalos tratados com plasma, foram mais propensos a iniciar em corridas com 2 anos de idade.

## 9 CONCLUSÃO

A equinocultura está em plena expansão e é responsável por grande geração de empregos e movimentação financeira dentro do agronegócio brasileiro. As perdas causadas por afecções uterinas como a endometrite persistente pós cobertura em éguas susceptíveis e a endometrose em éguas de alto valor comercial representam uma área de estudo onde os médicos veterinários atuantes na reprodução de equinos devem se focar para diminuir o prejuízo dos criadores. Um bom diagnóstico da doença aliado ao tratamento certo são pontos chaves para o sucesso. A utilização de terapias biológicas para tratar afecções uterinas está em desenvolvimento, mas já estão disponíveis aos veterinários a campo, principalmente para a utilização em éguas de alto valor genético/comercial devido aos custos ainda altos de alguns tratamentos.

Continua sendo de suma importância a pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção de tratamentos cada vez mais eficazes e que consigam prolongar a vida reprodutiva das fêmeas da espécie equina.

## REFERÊNCIAS

- ARGUELLES, D. *et al.* Clinical experiences with platelet-rich plasma as a treatment of tendon and ligament injuries in the horse. *In: Annual Scientific Meeting*, 16, 2005, Dublin. **Proceedings...** Dublin: European College of Veterinary Surgeons, 2005. p. 217-222.
- ARGUELLES, D. *et al.* Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Veterinary Record**, London, v. 162, n. 7, p. 208-211, Feb. 2008.
- BENSIDHOUM, M. *et al.* Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. **Blood**, New York. v.103, n.9, p.3313-3319, May 2004.
- BOCHSLER, P.N.; SLAUSON, D.O. Inflammation and repair of tissue. *In: SLAUSON, D.O.; COOPE, B.J. Mechanisms of disease*. St. Louis: Mosby, 2002. cap. 4, p.140-245.
- BORJESSON, D.L.; PERONI, J.F. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia. v.31, n.1, p.109-123, Mar. 2011.
- BRISKO, S. P. *et al.* Endometritis. *In: \_\_\_\_\_*. **Manual of equine reproduction**, 3<sup>rd</sup> ed. Maryland: Elsevier, 2011. cap. 6, p. 73-84.
- BROOKE, G. *et al.* Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Cell & Developmental Biology**, Los Angeles. v.18, n.6, p.846-858, Sep. 2007.
- CAMOZZATO, G. C. Endometrite em éguas. 2010. 35f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- CAUSEY, R.C. Mucus and the mare: how little we know. **Theriogenology**, Los Altos. v.68, n.6, p.386-394, May 2007.
- CARMONA, J.U. *et al.* Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar. v.17, n.3, p.167-170, Apr. 2007.
- CASLICK E.A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the thoroughbred mare. **Cornell Veterinary**, Cornell. v.27, n. 4, p.178, Dec. 1937.
- CASTILHO, L.F.F. **Endometrites na égua: plasma autólogo acrescido de leucócitos como forma de tratamento**. 1994. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

- CASTILHO, L.F.F. *et al.* Isolierung und Gefrierkonservierung von immunokompetenten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zur Endometritisbehandlung beim Pferd. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde**, Calw. v.13, n.5, p.437-444, Jan. 1997.
- CHEN, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam. v.40, n.5, p.815-820, Jan. 2008.
- DING, L. *et al.* Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. **Biomaterials**, Guilford. v.35, n.18, p.4888-4900, Mar. 2014.
- EL-SHARKAWY, H. *et al.* Platelet-Rich Plasma: growth factors and anti-inflammatory properties. **Journal of Periodontology**, Chicago. v.78, n.4, p.661-669, Apr. 2007.
- EQUINE endometritis: John P. Hughes: International Workshop. **Equine Veterinary Journal**, London, v.25, n.3, p.184-193, May, 1993.
- EVANS, M.J. *et al.* Factors affecting uterine clearance on inoculated materials. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge. v.35, p.327-334, 1987.
- FERRIS, R.A.; FRISBIE, D.D.; MCCUE, P.M. Use of mesenchymal stem cells or uterine conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. **Theriogenology**, Los Altos. v.82, n.1, p. 36-42, Jan. 2014.
- FLORES, J.M. *et al.* Endometriosis in the mares: incidence of histopathological alterations. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin. v.30, n.1, p.61-65, Apr. 1995.
- FRISBIE, D.D.; Smith, R.; Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket. v.42, n.1, p.86-89, Jan. 2012.
- FUMUSO, E. *et al.* Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the equine endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam. v.94, n.1-2, p.282-285, Mar. 2006.
- GARRETT, K.S. *et al.* Injection of platelet-and leukocyte-rich plasma at the junction of the proximal sesamoid bone and the suspensory ligament branch for treatment of yearling Thoroughbreds with proximal sesamoid bone inflammation and associated suspensory ligament branch desmitis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Ithaca. v.243, n.1, p.120-125, July. 2013.
- GUYTON, A.C. The lymphatic system. *In*: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Text-book of Medical Physiology**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. cap. 16. p.180-184.

HOFFMAN, C. *et al.* Morphofunctional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions-preliminary results. **Pferdeheilkunde**, Calw. v.19, n.6, p.666-669, Nov. 2003.

HOFFMANN, C. *et al.* The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam. v.111, n.2-4, p.261-278, Apr. 2008.

HUMPREYS, B.D.; BONVENTRE, J.V. Mesenchymal stem cells in acute injury kidney. **Annual Review of Medicine**. Palo Alto. v.59, p.311-325, 2008.

KAINER, R.A. Internal Reproductive Anatomy .In: MCKINNON, A. O. *et al.* (Ed.) **Equine Reproduction**. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2011. cap 168, p. 1589 -1590.

KATILA, T. *et al.* Lysozyme, alkaline phosphatase and neutrophils in uterine secretions of mares with differing resistance to endometrites. **Theriogenology**, Los Altos. v.33, n.3, p.723-732, Mar. 1990.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. **Biology of Reproduction**, Nova York. v.1, n.1, p.515-517, Feb. 1995.

KATILA, T. Uterine defence mechanisms in the mare. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam. v.42, p.197-204, Oct. 1996.

KELLER, A. **Avaliação morfológica-funcional da recuperação do endométrio equino através da infusão de neutrófilos imunocompetentes criopreservados, baseado em um modelo experimental definido**. 2004. 106f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on embryonic death. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Ithaca. v.172, n.3, p.241-262, Feb. 1978.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MOELOW, D.A. (Ed.). **Current Therapy in Theriogenology**, Philadelphia: W. B. Saunders Comp., 1986. p. 723-729.

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

LEBLANC, M.M. Oxytocin – the new wonder drug for treatment of endometritis? **Equine Veterinary Education**. Newmarket. v.6, p.39-43, July 1994.

LEBLANC, M.M. *et al.* Lymphatic clearance of India Ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometrites. **Biology of Reproduction**, New York. v.1, n.4, p.501-506, July 1995.

- LEBLANC, M.M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A.J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometrites in chronically infertile mares. **Theriogenology**, Los Altos. v.68, n.3, p.403-412, Aug. 2007.
- LEBLANC, M.M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.45, n.2, p.21-27, Jun. 2010.
- LEY, W.B. *et al.* Dimethyl Sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effects upon endometrial histological features and biopsy classification. **Theriogenology**, Los Altos. v.32, n.2, p.263-276 Aug. 1989.
- LYLE, S.K. Immunological Considerations *In*: MCKINNON, A. O. *et al.* (Ed.), **Equine Reproduction**. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2011. cap 268, p.2587-2596.
- MAMBELLI, L.I. *et al.* A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. **Theriogenology**, Los Altos. v.79 p.744-750 Mar. 2013.
- MAPA. **Equídeos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 12 nov. 2014.
- MARTIN, U. Method for studying stem cells: adult stem cells for lung repair. **Methods**, San Diego. v.45, n.2, p.121-132, Jun. 2008.
- MATTOS, R.C. *et al.* Effects of different postbreeding treatments on fertility of Thoroughbred mares. I. Intl. Konferenz uber Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde**, Calw. v.13, n.5, p.512-515, Sept. 1997.
- MATTOS, R.C. *et al.* Treatment of endometrites of experimentally infected mares: I-effect of lavage, plasma and leukocytes on uterine bacterial clearance. *Arquivos da Faculdade de Veterinária – UFRGS* v.27, n.1 p.49-60, Nov. 1999a.
- MATTOS, R.C. *et al.* Oxytocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of post-breeding endometrites in the horse. **Pferdeheilkunde**, Calw. v.15, n.6, p.584-587, Nov. 1999b.
- METCALF, E.S.; SCOGGIN, K.; TROEDSSON, M.H.T. The effect of platelet-rich plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following semen deposition. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar. v.32, n.8, p.498, Aug. 2012.
- METCALF, E.S. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar. v.34 p.128, Feb. 2014.

NELLY, D.P. *et al.* Prostaglandin release patterns in the mare: Physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge. v.27, p. 181-189, Feb. 1979.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, Londres. v.7 n. 3, p.86-88, Dec. 2003.

PARHAM, P. **The immune system**. 3 Ed. New York: Garland Science. 2009.

PAVÃO, G.D. **Utilização de células tronco mesenquimais autólogas para o tratamento de éguas com endometrite crônica degenerativa**. 2013. 66f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2013.

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

RAILA, G. Pathogenesis of equine endometrosis – an ultrastructural investigation. **Pferdeheilkunde**, Calw. v.13, p. 341-345, Feb. 1997.

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

REILAS, T. **Uterine luminal environment of the mare**, 2001. 99f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Helsinki, Finlândia, 2001.

RICHARDSON, L. The use of mesenchymal stem cells in the treatment of equine tendon injuries. **Apostila**. Department of Veterinary Clinical Sciences, The Royal Veterinary College, 2005.

RICKETTS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge. v.23, p.341-345, Oct. 1975.

RICKETTS, S. W. Endometrial curettage in the mare. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket. v.17, n.4, p.324-328, July 1985.

ROBERTS, C. Intrauterine kerosene in equids: Hospital perspectives. Proceedings of the John P. Hughes International Workshop of Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.25, n.3 p.186, 1993.

SCHOON, H.A. *et al.* Zur Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. In: Kongress der DVG, 1995, Hannover **Zusammenfassung...**Hannover: Dtsch. Vet. Med. Gesellschaft: Bericht des 21, 1995, p.273-282.

SOUZA, C.F. *et al.* Células-Tronco Mesenquimais: Células Ideais para a Regeneração Cardíaca? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, São Paulo. v.18, n.3, p.344-353, Jan. 2010.

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

TAYLOR, C.J. *et al.* Banking on human embryonic stem cells: Estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. **Lancet**, London. v.366, n.9502, p.2019-2025, Dec. 2005.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M. Uterine clearance of non-antigenic markers in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge. v.44, p. 283, July 1991.

TROEDSSON, M.H.T. *et al.* Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge. v.99, n.2, p.307-313, Nov. 1993.

TROEDSSON, M.H.T. Diseases of the uterus. *In*: ROBINSON, N.E. (Ed.) **Current Therapy in Equine Medicine 4**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. cap 12, p.517-524.

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

TROEDSSON, M.H.T. *et al.* Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam. v.68, n.3, p.273-278, Dec. 2001.

TROEDSSON, M.H.T. Endometritis. *In*: MCKINNON, A. O. *et al.* (Ed.) **Equine Reproduction**. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2011. cap 271, p.2608-2619.

VENTRUSCOLO, C.P. *et al.* Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro. v.32, p.106-110, May 2012.

WAELCHI, R.O.; WINDER, N.C. Immunohistochemical evaluation of the equine endometrium during the oestrus cycle. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket. v.19 n.4, p.299-302, July 1987.

WAELCHI, R.O.; WINDER, N.C. Mononuclear cell infiltration of the equine endometrium: immunohistochemical studies. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket. v.23, n.6, p.470-474, Nov. 1991.

WAITES, G.T.; BELL, S.C. Glycogen-induced intrauterine leukocytosis and its effect on mouse blastocysts implantation in vivo and in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge. v.66, n.2, p.563-568, Nov. 1982.

WOODALL, J. *et al.* Cellular effects of platelet rich plasma interleukin1 release from PRP treated macrophages. **Biomedical Sciences Instrumentation**, New York. v.44, p.489-494, Mar. 2008.

WIDDERS, P.R. *et al.* Specific antibody in the equine genital tract following systemic and local immunization. **Immunology**, Londres . v.54, n.4, p.763-769, Apr. 1985.

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