

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTUDOS SOBRE A AÇÃO DE LEUCÓCITOS
NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS**

ADRIANA PIRES NEVES

PORTE ALEGRE

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTUDOS SOBRE A AÇÃO DE LEUCÓCITOS
NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS**

ADRIANA PIRES NEVES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. RODRIGO COSTA MATTOS

Porto Alegre – RS

2004

ADRIANA PIRES NEVES

**INFLUÊNCIA DA INFUSÃO DE NEUTRÓFILOS IMUNOCOMPETENTES
CRIOPRESERVADOS NA RECUPERAÇÃO DO ENDOMÉTRIO EQÜINO,
BASEADO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DEFINIDO.**

APROVADA POR:

Donde los vientos me llevan,
Allí estoy como en mi centro
(José Hernandez)

. . . aber ein Mal im Leben, man muß arbeiten!
(Erich Klug)

AGRADECIMENTOS

Já que há muitos agradecimentos, vamos por partes.

Tierärztliche Hochschule Hannover: agradeço especialmente a meu co-orientador Prof. Dr. Erich Klug pela oportunidade de realizar o trabalho na Pferde Klinik e por sua acolhida. A meu co-orientador do Arbeitsgruppe Immunologie Prof. Dr. Wolfgang Leibold pelo acesso ao laboratório. Aos doutorandos Fabian Engelke e Jörg Franke pelos ensinamentos sobre citometria de fluxo, apoio e amizade. Ao Prof. Dr. Holm Zerbe (Rinderklinik) por sua contribuição ao trabalho. Ao Prof. Dr. Herrmann Bader pelo acesso ao Institut für Reproduktionsmedizin para o congelamento dos leucócitos, e às técnicas Petra Hasenleder e Frauke Fricke pelo auxílio com o aparelho de congelamento. Às secretárias da Klinik für Pferde, Frau G. Andritzky e Frau I. Kerzel, pelo apoio “burocrático”. Às técnicas do laboratório da Pferde Klinik, Barbara Temme e Anja Seemann-Jensen, pelo acesso ao laboratório e ensinamentos. Aos amigos que compartilharam bons e maus momentos, e alguns até auxiliaram com a “sangria” das éguas e alguns passos do congelamento: Augusto Almeida Sampaio, Paula Guttmann, Tanja Groh, Sol Naranjo Moreno, Luis Rubio, Raul Monsalve, Márcia Cristina Oliveira Cavalcanti, Bruno Leite, Sandra Fiala, Ivan Barros Filho, Aldair Simon, Darko Bosnakowski, Victoria von Mutius, Michael Kleingers, Monica Venner. Finalmente, e não menos importante, a Frau Maritta Ledwoch, do Akademiker Auslandsamt pelo auxílio e pela infinita paciência.

Não poderia esquecer daquelas (alemãs e brasileiras) que, literalmente, deram seu sangue para que este trabalho fosse possível.

Faculdade de Veterinária da UFRGS- Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos, pela oportunidade de realizar este trabalho e por seus valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory, pela amizade.

Ao Prof. Marcos J. P. Gomes e ao Prof. Joaquim Fernandes, pelo acesso ao Laboratório de Bacteriologia, por ceder a bactéria utilizada e boa vontade em compartilhar seus conhecimentos.

A Professora Vera Beatriz Wald, pela orientação estatística.

À Professora Marisa Cardoso (Medicina Veterinária Preventiva), pela orientação na parte bacteriológica e uso de seu laboratório.

À Cristina Rodrigues Trein (mestranda) e Gabriella Möller (bolsista de iniciação científica) responsáveis pelo cultivo das bactérias e seu envio, meu agradecimento especial.

Aos bolsistas e estagiários do REPROLAB: Maria Cristina Caldart de Andrade, Andreza Morais de Souza, Ederson Luis Camello de Andrade, Liziane Azevedo, Marcelo Serpa, Julio César Mello Vieira, pelo auxílio na parte experimental e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Gelpi Mattos, pelo auxílio na redação da dissertação.

À CAPES, pela concessão da bolsa para realização deste trabalho e também dos recursos do PROBRAL/CAPES/DAAD.

Aos colegas do REPROLAB, Médicos Veterinários Adriana Tarouco, Andrea Keller, Eduardo Malschitzky, Enio Luís Ribeiro de Brito, Frederico Lança Schmitt, Magda Jochims Vieira, Sandra Fiala, pela amizade. Aos Srs. Giselto Krutzmann (Agrovin) e Vicente Izquierdo Rujas (Haras La Cibeles), pela doação das éguas usadas no experimento.

Às funcionárias da Coordenação do PPG em Ciências Veterinárias, Carmen Lúcia Belmonte Ribeiro, Andréa Aquino Ferreira Antunes e Vera Luiza Saraiva da Rocha, pela constante disponibilidade.

À diretoria e funcionários da FAURGS, pela cessão de seu espaço e computadores para confecção deste trabalho.

Coudelaria de Rincão (São Borja- RS)- em primeiro lugar, agradeço ao Cel. Vet. Antônio Paulo Alves da Silva, por disponibilizar a estrutura e comandados , bem como animais, da Coudelaria, para a execução do experimento. Também por sua hospitalidade e constante disponibilidade. Ao Ten. Vet. Marcello Espellet Menezes, chefe da Seção Veterinária, por disponibilizar o espaço para o trabalho. Aos Tenentes Veterinários Júlio César de Assis Brasil, Carlos Bayard Martins Pinheiro, Rafael Rodrigues, Ramão Remízio de Miranda Batista, Alexandre Ilha Moreira, Evaristo Pinheiro, Alceu Caetano Braga, pelo auxílio e amizade. Aos Sgts. Álvaro e Barreto; Cabos Garcia e Menezes; Soldados Peixoto, Santos, Godoy, Éder, e os demais da Seção Veterinária, pela ajuda no experimento. Aos estagiários: Sabrina Vizeu, Márcio Cortes Alves, Luciane Tabbert Benthien, pelo auxílio e pela convivência.

Outros agradecimentos-

Aos Médicos Veterinários Mário Belmonte Moglia e Walter Nunes Flores, pelo incentivo e amizade.

A meu esposo, Sérgio Ivan dos Santos, pelo estímulo, carinho e dedicação. Também por suportar minhas ausências, e mesmo de longe incentivar meu trabalho.

À minha família, por sempre crer que estudo e formação são essenciais. E a meu pai, que sempre incentivou a nunca parar de aprender.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	10
	ABSTRACT.....	12
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	ENDOMETRITES: ETIOLOGIA E PATOGENIA.....	15
2.2	MECANISMOS DE DEFESA UTERINOS.....	17
2.2.1	MECANISMOS FÍSICOS.....	17
2.2.1.a	FECHAMENTO E POSICIONAMENTO DA VULVA.....	17
2.2.1.b	CONTRATILIDADE MIOMETRIAL E EFICIÊNCIA DA CÉRVICE.....	18
2.2.1.c	MUCO UTERINO.....	19
2.2.1.d	CIRCULAÇÃO LINFÁTICA E SANGÜÍNEA.....	20
2.2.2	MECANISMO HUMORAL.....	21
2.2.3	MECANISMO CELULAR.....	22
2.2.4	OUTROS.....	24
2.2.4.a	PLASMA SEMINAL.....	24
2.3	INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL.....	25
2.4	DIAGNÓSTICO DA ENDOMETRITE BACTERIANA.....	26
2.4.1	EXAME CLÍNICO.....	26
2.4.2	EXAMES COMPLEMENTARES	27
2.4.2.a	CITOLOGIA ENDOMETRIAL.....	27
2.4.2.b	EXAME BACTERIOLÓGICO.....	28
2.5	TRATAMENTO DA ENDOMETRITE BACTERIANA.....	29
2.5.1	LAVAGEM UTERINA.....	29
2.5.2	ANTIBIOTICOTERAPIA.....	30
2.5.3	ADMINISTRAÇÃO DE AGENTES ECBÓLICOS.....	31
2.5.4	INFUSÃO UTERINA DE PLASMA HOMÓLOGO.....	34

2.5.5	INFUSÃO DE PLASMA HOMÓLOGO ACRESCIDO DE LEUCÓCITOS.....	35
2.6	CRIOPRESERVAÇÃO DE LEUCÓCITOS EQÜINOS.....	36
2.7	INFECÇÕES EXPERIMENTAIS.....	37
2.8	CITOMETRIA DE FLUXO.....	38
2.9	QUIMIOTAXIA DE LEUCÓCITOS.....	39
3	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO.....	40
3.1	ARTIGO 1.....	40
3.2	ARTIGO 2.....	60
4	CONCLUSÕES.....	86
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
6	ANEXOS.....	111

RESUMO

As endometrites bacterianas são uma das principais causas de infertilidade na égua. Entre os tratamentos utilizados nesta patologia, estão as infusões uterinas de plasma homólogo acrescido de leucócitos e a infusão de leucócitos heterólogos criopreservados. O presente trabalho teve por objetivo realizar testes *in vivo* e *in vitro*, que foram descritos em dois artigos. No primeiro artigo, objetivou-se avaliar *in vitro* a quimiotaxia dos leucócitos eqüinos em relação a diferentes quimioatraentes, bem como sua vitalidade e produção de radicais livres de oxigênio (ROS) pós-descongelamento. No experimento 1, testou-se dextrose em concentrações de 0, 1, 2 e 6%, acrescida ou não de interleucina-8 (IL-8), como quimioatraente para leucócitos eqüinos suspensos em salina fosfatada tamponada (PBS) ou em R3F; no experimento 2, testou-se plasma homólogo ou heterólogo, a 3% (com ou sem IL-8), 10, 30, 60 e 90%, como quimioatraente; no experimento 3, foi testada a quimiotaxia de leucócitos íntegros em relação a diferentes quantidades de leucócitos lisados. O experimento 4 avaliou a vitalidade e a geração de ROS pelos leucócitos após o descongelamento, comparando quatro graus de diluição em NaCl e PBS. Concluiu-se que a dextrose não apresenta bom efeito quimioatraente para leucócitos eqüinos. Dentre as concentrações de plasma utilizadas, concentrações de plasma homólogo entre 10% e 60% apresentam bom efeito quimiotático. Já o plasma heterólogo apresentou boa atração de leucócitos quando em concentrações de 10% e de 30%. Na concentração de $10 \times 10^6 / \text{mL}$, os leucócitos lisados foram capazes de atrair leucócitos em proporção semelhante à da IL-8. Com relação aos testes-pós-descongelamento, células ressuspensas em PBS ou NaCl apresentam vitalidade e geração de radicais livres de oxigênio semelhantes, quando incubados por até 15 minutos. No segundo artigo, realizaram-se testes *in vivo* comparando cinco tratamentos em éguas, em estro, experimentalmente infectadas com *Streptococcus equi* subsp.*zooepidemicus*. Foram utilizadas 25 éguas, 20 consideradas resistentes, e 5 éguas suscetíveis à endometrite. Após 24 horas, os animais foram submetidos a exame clínico, bacteriológico e citológico. Com a presença de quadro clínico de endometrite, as éguas eram submetidas a um dos seguintes tratamentos: 1-Infusão de 120mL de plasma homólogo com de leucócitos frescos; 2-- Infusão de 4 mL contendo 800×10^6 leucócitos íntegros, congelados; 3-Leucócitos lisados - Infusão de 4 mL contendo

800 x 10⁶ leucócitos lisados; 4- IL-8- Infusão de 4 mL contendo 25 ng/mL de IL-8 congelada; 5-Controle – Infusão de 4 mL de meio R3F congelado. Os exames clínico, bacteriológico e citológico foram realizados diariamente até o sétimo dia pós-infecção, ou até a eliminação da bactéria, ou até a ausência de neutrófilos no esfregaço citológico. Após os exames, as éguas receberam o tratamento designado, sendo estes realizados diariamente até a ausência de crescimento bacteriano no exame microbiológico ou por, no máximo, quatro dias. No sétimo dia, todas as éguas foram tratadas com infusão intra-uterina de 5.000.000 UI de penicilina G potássica cristalina. Após o término de um tratamento, aguardava-se cerca de sete dias para a reinfecção, num outro ciclo, quando um outro tratamento era aplicados. Todas as éguas foram submetidas a todos os tratamentos, perfazendo um total de 125 infecções experimentais num delineamento experimental do tipo Quadrado Latino. Não se observaram diferenças significativas no tempo de eliminação bacteriana nas éguas resistentes. Entretanto, nas éguas susceptíveis, observou-se uma cura bacteriana mais rápida quando as éguas foram tratadas com leucócitos frescos, leucócitos congelados e leucócitos lisados, em relação às tratadas com IL-8 e as do grupo controle. Concluiu-se que o efeito bactericida dos leucócitos viáveis ou lisados, associados ou não à presença de fatores de opsonização do plasma, foi o responsável pela cura bacteriológica e que o efeito quimioatraente de neutrófilos, plasma, restos celulares e IL-8 não influiu no tempo de eliminação bacteriana.

ABSTRACT

Bacterial endometritis is one of the major causes of infertility in mares. Uterine infusion of autologous plasma with leukocytes and infusion of frozen heterologous leukocytes are treatments proposed for bacterial endometritis. The present study aimed to do *in vivo* and *in vitro* tests, described in two articles. The aim of the first article study was to test, *in vitro*, chemotaxis of equine leukocytes towards different chemoattractants, as well as its vitality and generation of reactive oxygen species (ROS) post-thawing. Experiment 1 tested chemotactic power of dextrose 0, 1, 2 and 6%, with and without interleukin-8 (IL-8), to attract equine neutrophils; experiment 2 tested homologous and heterologous plasma in the concentrations 3% (with and without IL-8), 10, 30, 60 and 90%, as chemoattractant for equine leukocytes; in experiment 3, the chemotaxis of normal equine leucocytes was tested towards different concentrations of lysed leukocytes. Experiment 4 evaluated vitality and generation of reactive oxygen species (ROS) of frozen-thawed equine leukocytes, diluted either in NaCl or PBS. It was concluded that dextrose doesn't have a good chemotactic effect on equine leukocytes. The homologous plasma concentrations between 10% and 60% have a good chemoattractant effect. Heterologous plasma had a good leukocyte attraction when in the concentrations of 10% and 30%. Lysed leukocytes, at a concentration of 10×10^6 /mL, had a chemotactic effect similar to that of IL-8. The post-thawing tests showed that cells resuspended in PBS or NaCl have a similar vitality and ROS, when incubated during 15 minutes. The second article compared, *in vivo*, five treatments in estrous mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp.*zooepidemicus*. Twenty five mares were used, twenty of them resistant, and five susceptible to endometritis. Cycles were synchronized so that mares were in estrus in the day of infection. Mares were infected with 1×10^9 *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in 20mL of PBS. Twenty four hours after the inoculation, clinical, bacteriological e cytological examinations were performed. All mares showed clinical signs of endometritis, and were assigned to one of the following treatments: 1- Fresh leukocytes: Infusion of 120mL homologous plasma with leukocytes; 2- Frozen leukocytes: Infusion of 4 mL containing 800×10^6 frozen leukocytes; 3- Lysed leukocytes: Infusion of 4 mL containing 800×10^6 frozen lysed leukocytes; 4- IL-8- Infusion of 4 mL containing

25 ng/mL of frozen IL-8; 5-Control- Infusion of 4 mL containing frozen R3F. Clinical, bacteriological and cytological examinations continued daily until the seventh day after infection, or until bacterial elimination, or until absence of neutrophils in the cytologic smear. After clinical, bacteriological and cytological examinations, mares were treated with the assigned treatment. Treatments were performed daily until no bacterial growth was found or for no more than four days. On the seventh day, all mares were treated with an uterine infusion of 5.000.000 IU Penicillin G. After the end of a treatment, there was an interval of seven days until the beginning of the next cycle, when a new treatment was applied. All mares were submitted to all treatments, in a total of 125 experimental infections, in a crossover design with two Latin Squares. No significant difference was found in the time for bacterial elimination in resistant mares. However, in susceptible mares, there was a faster bacterial elimination when mares were treated with fresh, frozen or lysed leukocytes, in comparison to IL-8 and control group. It was concluded that the bactericidal effect of viable or lysed leukocytes, associated or not to plasma opsonizing factors, was responsible for the elimination of bacteria and that the chemotactic effect of neutrophils, plasma, cellular debris and IL-8 did not influence the time needed for the elimination of bacteria.

1 INTRODUÇÃO

A espécie eqüina é considerada como a de pior eficiência reprodutiva entre as espécies de animais domésticos (Merkt *et al.*, 1979; Voss, 1984). O estudo aprofundado das causas desta particularidade é relativamente recente (Caslick, 1937). Voss, em 1984, definiu as causas de subfertilidade ou de infertilidade na égua como sendo três: transtornos endócrinos, deficiências nutricionais e inflamações uterinas.

As endometrites bacterianas são consideradas como das maiores causas de infertilidade na espécie eqüina (Hughes e Loy, 1975). O útero da égua é contaminado por bactérias em situações de cobertura, parto ou exames ginecológicos (Castilho, 1994). Algumas éguas, ditas resistentes, conseguem eliminar o agente infeccioso em um prazo de 48 a 96 horas (Troedsson *et al.*, 1995), enquanto outras, ditas susceptíveis, por falhas em seus mecanismos de defesa uterina, não conseguem fazê-lo (Watson, 1988b; Troedsson *et al.*, 1995).

Muitos tratamentos foram propostos nos últimos anos para as endometrites bacterianas. A prevenção seria feita pelo uso de técnicas que diminuam a contaminação por ocasião da monta natural ou inseminação artificial (Kenney *et al.*, 1975). A grande maioria dos tratamentos propostos busca auxiliar os mecanismos de defesa uterina através do uso de drogas ecbólicas (LeBlanc, 1994), lavagens uterinas (Asbury, 1990), infusões de plasma homólogo (Allen, 1991) e de plasma homólogo acrescido de leucócitos (Castilho, 1994; Neves, 1998).

O objetivo deste trabalho foi testar, *in vitro*, diferentes agentes quimiotáticos para leucócitos eqüinos, além de realizar testes de vitalidade e de geração de radicais livres de oxigênio em leucócitos criopreservados após o descongelamento. Também objetivou-se, após a criação de um banco de leucócitos criopreservados, testar o uso dos mesmos no tratamento de éguas susceptíveis e resistentes experimentalmente infectadas por *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, em comparação com outros tratamentos que auxiliariam a defesa uterina (plasma homólogo acrescido de leucócitos frescos, leucócitos lisados criopreservados, interleucina 8 criopreservada e um grupo controle composto de meio R3F, também criopreservado).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Endometrites : Etiologia e Patogenia

Endometrites são alterações inflamatórias agudas ou crônicas que ocorrem no endométrio, geralmente de natureza infecciosa (Kenney, 1993). Em éguas, as endometrites bacterianas são consideradas a principal causa de infertilidade (Voss, 1984; Silva, 1989). A contaminação do trato genital da égua pode ocorrer em três situações: monta natural, exame ginecológico, ou parto (Ricketts e Macintosh, 1987; Castilho, 1994).

Durante a cobertura, o pênis do garanhão introduz no aparelho genital feminino, além dos espermatozóides, bactérias e debris, que são depositados diretamente no lúmen uterino (Ricketts e Macintosh, 1987). Como decorrência natural do trabalho de parto, também ocorre uma contaminação, que persiste durante toda a involução uterina (Ricketts e Macintosh, 1987). Nos primeiros dias após o parto, mesmo havendo involução uterina normal, a carga bacteriana encontrada no útero é mais elevada (Gygax *et al.*, 1978). Um exame ginecológico realizado sem as devidas precauções de limpeza da genitália externa e sem esterilização do material pode carrear contaminantes para o lúmen uterino (Ricketts e Macintosh, 1987).

As éguas que conseguem eliminar facilmente a contaminação são ditas éguas resistentes à endometrite. Já as éguas que falham em eliminar o agente desenvolvem endometrite persistente, sendo denominadas éguas susceptíveis à endometrite (Farrelly e Mullaney, 1964; Hughes e Loy, 1969; Kenney *et al.*, 1975). Foi também proposto que, para classificar uma égua como suscetível à endometrite, seria mais acurado combinar o histórico reprodutivo, sinais clínicos e a histologia endometrial (Pycock *et al.*, 1997). Além disso, as éguas deveriam sofrer uma agressão bacteriana ao útero para determinar sua resistência ou susceptibilidade à infecção (Liu *et al.*, 1993). Troedsson *et al.* (1995) propuseram que égua suscetível seria aquela que, submetida a uma infecção experimental com *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, não fosse capaz de eliminá-la em um prazo de 96 horas. A idade e o número de partos estariam em relação direta com a probabilidade de ocorrência de infecção persistente (Hughes e Loy, 1969). Em um levantamento sobre uma

população de 90.000 éguas Puro Sangue de Corrida, Baker *et al.* (1992) encontraram um decréscimo progressivo da fertilidade a partir dos 8 anos de idade. Entretanto, podem ocorrer alterações endometriais em éguas de pouca idade, independentemente do seu estado reprodutivo (Schoon *et al.*, 1997), bem como éguas com histórico de endometrites recorrentes podem se beneficiar da correção da pneumovagina.

O agente causador de endometrites mais comumente isolado e identificado é o *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (Wingfield-Digby e Ricketts, 1982; Welsh, 1984; Ferreiro *et al.*, 1986; Langoni *et al.*, 1994). Em um estudo de 1500 amostras cervicais de éguas Puro Sangue de Corrida (PSC), obtidas de 1966 a 1969, Merkt e Von Leppel (1970) encontraram uma porcentagem de 78% de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento de uma infecção bacteriana no útero, sendo o principal deles a adesão bacteriana (Wittenbrink *et al.*, 1997). Esta resulta de estruturas chamadas adesinas, presentes na superfície da bactéria, e de receptores na célula do hospedeiro. O *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* se liga à fibronectina, encontrada em membranas celulares de mamíferos, mas ainda não está estabelecido se isto contribui para sua patogênese no endométrio equino. Ferreira-Dias *et al.* (1994), comparando a adesão de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* a tecidos de biópsias endometriais de todas as categorias, demonstraram que a adesão do *Streptococcus* é maior ao endométrio da categoria III (Kenney e Doig, 1986) durante o estro. Caso a classificação endometrial fosse ignorada, não haveria diferenças significativas para a adesão da bactéria à superfície do endométrio entre as diversas fases do ciclo estral.

A adesão das bactérias a superfícies naturais e sintéticas se faz através dos biofilmes, cuja formação depende de extenso glicocálix produzido pela bactéria (Khaderi e Yassien, 1995). Durante o processo de adesão, as bactérias se justapõemumas às outras e produzem uma matriz de polissacarídeos, que formam um polímero extracelular genericamente chamado glicocálix (Costerton *et al.*, 1995). A isto se denomina biofilme (Hoyle e Costerton, 1991). As bactérias assim organizadas são pelo menos 500 vezes mais resistentes a agentes antibacterianos e à fagocitose (Costerton *et al.*, 1995).

2.2 Mecanismos de Defesa Uterinos

Após a invasão bacteriana do endométrio, inicia-se um processo de resposta inflamatória ao agente, que permite que a maioria das éguas o elimine em até 96 horas (Hughes e Loy, 1969; Ricketts e McIntosh, 1987; Troedsson *et al.*, 1995). Isto se deve à ação dos chamados mecanismos de defesa uterina, os quais se subdividem em mecanismos físicos, mecanismo celular e mecanismo humorai. Além destes, o plasma seminal também poderia ser considerado como mecanismo de defesa.

2.2.1 Mecanismos Físicos

Entre os mecanismos físicos que contribuem para a defesa uterina incluem-se o fechamento dos lábios vulvares e o posicionamento da vulva (Caslick, 1937), a contratilidade do miométrio (LeBlanc *et al.*, 1989) e a eficiência da cérvix (Mattos, 1989), além da produção de muco pelo endométrio (Causey *et al.*, 1997), da circulação sanguínea e da linfática. Esses mecanismos são considerados a primeira barreira contra as endometrites bacterianas (Mattos, 1989).

a) Fechamento e Posicionamento da Vulva

A conformação vulvar ideal é aquela onde os lábios estão perfeitamente coaptados e em posicionamento vertical. Sua comissura superior deve se encontrar aproximadamente ao mesmo nível do assoalho da pelve (Caslick, 1937; Rossdale e Ricketts, 1980). Variações nesses padrões podem levar a falhas reprodutivas decorrentes da entrada de ar e consequente contaminação na vulva. Pascoe (1993) relatou que, de 502 éguas cobertas no cio do potro, 66% conceberam após a realização de vulvoplastia, ao passo que, das éguas não suturadas, apenas 34% conceberam. De acordo com Malschitzky (1998), houve diferenças significativas quanto às taxas de prenhez de éguas com má conformação perineal e éguas que não necessitavam de correção cirúrgica mesmo que, nas éguas com problemas de conformação, a correção fosse feita logo após a ovulação. As técnicas de correção cirúrgica de Caslick (1937), Götze (1949) e de Pouret (1982) são as mais conhecidas. No Brasil, é bastante utilizada a técnica de Silva (1983).

b) Contratilidade Miometrial e Eficiência da Cérvice

A contratilidade miometrial é considerada um potente mecanismo de limpeza físico do útero (LeBlanc *et al.*, 1989a), drenando os contaminantes depositados no lúmen uterino por ocasião da cobertura, no que é auxiliada pelo relaxamento da cérvix (Black *et al.*, 1953; Mattos, 1989). Éguas mais velhas têm essa capacidade de limpeza diminuída, razão pela qual, após a cobertura, há maior acúmulo de conteúdos no seu útero (LeBlanc *et al.*, 1989a), podendo constituir um meio ideal para o crescimento bacteriano (Allen e Pycock, 1989).

Troedsson e Liu (1991) analisaram a atividade miometrial de éguas susceptíveis e resistentes à endometrite após a inoculação com *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* durante o estro. Nas primeiras oito horas, a atividade miometrial de ambos os grupos era idêntica. Porém, no grupo de éguas suscetíveis, esta atividade diminuiu sensivelmente após este intervalo de tempo. Em um estudo feito por LeBlanc *et al.* (1994a) sobre a eliminação de um radiocolóide do útero analisada pela cintilografia, verificou-se que, enquanto éguas resistentes drenam quase todo o radiocolóide em trinta minutos, as éguas susceptíveis não eliminam praticamente nada neste espaço de tempo. Porém, nem todas as éguas classificadas como susceptíveis retiveram radiocolóide após sua infusão, e nem todas as ditas resistentes eliminaram mais de 50% do mesmo (LeBlanc *et al.*, 1994b). Após uma injeção de oxitocina, tanto éguas susceptíveis como resistentes eliminaram quase 90% do radiocolóide (LeBlanc *et al.*, 1994b). De acordo com Katila (1999), o exame cintilográfico permite a visualização das contrações uterinas, sua direção e o movimento do líquido infundido.

Nikolakopoulos *et al.* (2000), analisando níveis de oxitocina endógena liberados após uma inseminação artificial com sêmen resfriado e diluído, não encontraram diferença significativa entre éguas resistentes e susceptíveis. No entanto, os níveis de PGF_{2α} foram maiores nas éguas susceptíveis que nas resistentes. Como a contratilidade e a limpeza uterina são menores nas éguas susceptíveis, poder-se-ia deduzir que o estiramento do miométrio causado por repetidas gestações ocasionaria algum dano às terminações nervosas e fibras musculares do miométrio, interferindo assim com a limpeza uterina (De Lille *et al.*, 2000).

A cérvico também funciona como barreira contra as infecções uterinas. Na égua, ela é formada por duas camadas de musculatura lisa (Sisson & Grossmann, 1975). Os principais fatores que interferem na função cervical e, consequentemente, na introdução de patógenos, são lacerações e traumas no momento do parto que podem impedir total ou parcialmente o fechamento da cérvico (Mattos, 1989). A drenagem cervical também é crítica para o acúmulo de líquido uterino. Pycock (1996) recomendou a dilatação manual da cérvico junto à administração de ocitocina e tratamentos intra-uterinos em éguas suscetíveis à endometrite, para facilitar a eliminação de líquidos existentes no útero.

c) Muco Uterino

No endométrio eqüino há células ciliadas que secretam muco, que é composto de glicoproteínas, proteoglicanos, lipídios, DNA, células e debris (Causey *et al.*, 1997). Segundo o autor, o muco é secretado pelo epitélio luminal e levado pelos cílios em direção à cérvico, evitando assim a adesão bacteriana a membranas das células do epitélio luminal. Também imunoglobulinas presentes no muco neutralizariam as bactérias e a lisozima destruiria suas paredes celulares.

De acordo com Morresey (1997), a percentagem de células ciliadas anormais é maior nas éguas com limpeza uterina retardada. Causey *et al.* (1997) verificaram as diferenças de produção de muco entre éguas suscetíveis e resistentes nas diversas fases do ciclo estral, e perceberam que o acúmulo de muco é maior nas éguas suscetíveis. Também observaram que a produção de muco e o número de células ciliadas estão aumentados nos ninhos glandulares fibróticos.

Tiplady *et al.* (2001) e Allen *et al.* (2002) analisaram a viscosidade do muco uterino de éguas em estro e diestro, concluindo que, na ausência de uma boa contratilidade uterina, o conteúdo agiria como um gel, aderindo à superfície do endométrio. Porém, com o aumento da contratilidade, a viscosidade do conteúdo diminui, facilitando a eliminação do muco.

d) Circulação Linfática e Sanguínea

Uma resposta inflamatória aguda normalmente ocorre a partir da deposição de sêmen no útero. Os achados clássicos incluem aumento da permeabilidade vascular, edema intersticial e aumento do fluxo linfático. Éguas multíparas que se tornaram inférteis apresentam lacunas linfáticas no endométrio, o que sugere que a drenagem linfática possa estar prejudicada nestas éguas. De acordo com LeBlanc *et al.* (1994a), vasos linfáticos e linfonodos, durante o diestro, drenam o excesso de fluido e partículas da submucosa e do lúmen uterino. Os pequenos vasos linfáticos não possuem musculatura lisa e precisam das contrações uterinas para movimentar a linfa dorsalmente. Éguas com drenagem linfática deficiente tendem a acumular líquidos no útero, apresentar cistos linfáticos visíveis à ultra-sonografia e são freqüentemente sub-férteis (LeBlanc, 1997).

O padrão vascular de uma biópsia endometrial de éguas susceptíveis geralmente apresenta angiose moderada a severa, freqüentemente associada à endometrose. A angiose está relacionada à idade e ao número de paríções da égua. As angiopatias têm um papel importante na redução da perfusão endometrial e na diminuição da drenagem linfática (Schoon *et al.*, 1997; Schoon *et al.*, 1999). Blaich *et al.* (1999) utilizaram ultra-sonografia transretal com *Doppler* para avaliar o fluxo sangüíneo uterino em éguas de todos os grupos de biópsia endometrial, no estro e no diestro. Através deste exame, foram detectadas alterações cíclicas no fluxo sangüíneo uterino, sendo este maior na fase peri-ovulatória. Nas éguas com endometrose houve menor fluxo, causando uma menor perfusão do útero nestas éguas. De acordo com Ludwig *et al.* (2002), éguas com alterações severas a moderadas do endométrio têm uma resistência vascular significativamente maior comparadas às éguas com alterações leves ou ausentes. Esta resistência vascular também é maior na artéria uterina em éguas com angiopatias endometriais. Estrógenos e óxido nítrico circulantes também funcionam como moduladores do fluxo sangüíneo uterino (Bollwein *et al.*, 2002). Na tentativa de aumentar a perfusão sangüínea do útero, foram testadas três drogas anticoagulantes ou vasodilatadoras para avaliar seu efeito no fluxo sangüíneo uterino: ácido acetil-salicílico, captopril e dinitrato de iso-sorbida (Bollwein *et al.*, 2001). Foi concluído que o fluxo sangüíneo uterino pode ser

melhorado pela administração destas drogas. Porém, são necessárias investigações sobre um possível efeito positivo na fertilidade.

2.2.2 Mecanismo Humoral

Após uma contaminação bacteriana do útero ocorre um rápido afluxo de secreções (Watson, 1988a), que pode ser caracterizado como exsudato por envolver saída de proteínas do sistema vascular para o tecido intersticial ou cavidades. O exsudato uterino é rico em proteínas plasmáticas, fatores de opsonização e células inflamatórias (Watson, 1988a).

Os primeiros a isolar imunoglobulinas das secreções uterinas em eqüinos foram Kenney e Khaleel (1975). Estes, usando as técnicas de imunodifusão e imunofluorescência, encontraram IgGa, IgGc, IgG(B), IgT, IgM e IgA no trato genital de éguas. Mitchell *et al.* (1982) concluíram que a IgA é produzida e secretada localmente pela mucosa uterina. Isto foi confirmado por Widders *et al.* (1985) que, usando a técnica de eletroforese, demonstrou que também a IgG é secretada localmente no trato genital de éguas.

O endométrio foi considerado por Widders *et al.* (1985) como parte do sistema imune de mucosas, devido à sua capacidade de produzir e secretar diferentes classes de imunoglobulinas. Asbury *et al.* (1980) descobriram que as secreções uterinas de éguas susceptíveis continham mais imunoglobulinas que as de éguas resistentes. Mitchell *et al.* (1982) e Williamson *et al.* (1987) confirmaram esse achado.

Vários autores buscaram uma comparação entre as concentrações de imunoglobulinas de éguas susceptíveis e resistentes. Foram encontradas maiores concentrações de IgA e IgG nos lavados uterinos de éguas susceptíveis (Asbury *et al.*, 1980; Mitchell *et al.*, 1982; Varner e Blanchard, 1990; Waelchli e Winder, 1991). Por outro lado, Troedsson *et al.* (1993a) encontraram, em éguas susceptíveis e resistentes infectadas experimentalmente, as mesmas concentrações de IgA e menores concentrações de IgG e de proteínas do sistema do complemento nas éguas suscetíveis, concluindo que, provavelmente, a deficiência da defesa uterina em éguas suscetíveis não se deve à imunodeficiência local. Esse fato foi confirmado por Johnson *et al.* (1994), ao compararem as concentrações de opsoninas nos lavados

uterinos de éguas ovariectomizadas tratadas com estrógenos ou progesterona. A concentração de imunoglobulinas nestes lavados não teve efeito direto na fagocitose de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, sugerindo que outros fatores no ambiente uterino podem ser importantes na ativação das defesas uterinas.

Para LeBlanc *et al.* (1991), altos níveis de IgA seriam deletérios, pois poderiam diminuir a capacidade da IgM e da IgG de opsonizar, bloqueando os sítios antigênicos nas bactérias. Embora as imunoglobulinas sejam componentes essenciais da defesa uterina, seu papel na susceptibilidade à endometrite bacteriana ainda não está bem elucidado. É possível que a interação entre imunoglobulinas e neutrófilos seja mais importante que a concentração de imunoglobulinas (Liu e Cheung, 1986).

A concentração de proteínas nos lavados uterinos foi estudada por diversos autores. Asbury *et al.* (1980) e Williamson *et al.* (1987), analisando lavados uterinos de éguas susceptíveis e resistentes na ausência de infecções, encontraram concentrações semelhantes de proteínas nos dois grupos. Outros pesquisadores, porém, encontraram maiores concentrações de proteínas em éguas suscetíveis que em éguas resistentes (Blue *et al.*, 1982; Pycock e Allen, 1990). Mais recentemente, Bader *et al.* (1997) procuraram caracterizar, através de eletroforese, os tipos de proteínas existentes nos lavados uterinos de éguas suscetíveis e resistentes. Nas éguas resistentes foram detectadas três bandas típicas de proteínas (22kDa, 17kDa e <6,5kDa) durante a fase lútea. Estas foram identificadas como Fosfolipase A2 (17 KDa) e uteroglobina (<6,5kDa). A proteína de 22kDa não foi identificada. Em um grupo de dez éguas suscetíveis, numa tentativa de caracterizar as proteínas, apenas uma demonstrou os padrões típicos de proteínas acima descritos. As demais tiveram deficiência nas bandas de 17 e 22kDa. Testando-se a fertilidade destas éguas, verificou-se que as éguas suscetíveis que possuíam deficiência de proteínas na secreção uterina da fase lútea não ficaram prenhas.

2.2.3 Mecanismo Celular

No útero, os neutrófilos são os principais responsáveis pela fagocitose, que consiste na ingestão e digestão celular de partículas estranhas. Eles estão presentes

no útero de éguas reprodutivamente sadias trinta minutos após uma infecção experimental (Allen & Pycock, 1989).

Segundo Liu *et al.*, 1985, neutrófilos obtidos do útero de éguas com histórico de infertilidade mantêm sua capacidade de deformação na diapedese inalterada até doze horas após o início do processo inflamatório tornando-se posteriormente inativos, o que não ocorre com neutrófilos de éguas sadias. Porém, os mesmos autores não encontraram diferenças quanto à fagocitose e quimiotaxia dos neutrófilos sanguíneos entre éguas susceptíveis e resistentes. Estes achados foram confirmados por Barros (1997). Para Watson *et al.* (1987a), os neutrófilos sanguíneos e uterinos de éguas suscetíveis têm menor capacidade migratória e fagocítica, respectivamente, que os de éguas resistentes, e os neutrófilos sanguíneos de éguas suscetíveis têm sua função fagocítica inalterada. Produtos tóxicos da atividade bactericida poderiam estar deprimindo a função dos neutrófilos uterinos, assim como defeitos na quimiotaxia e na fagocitose podem resultar em menor capacidade bactericida (Allen e Pycock, 1989). Contrariamente, Troedsson *et al.* (1993b), como resultado de vários experimentos comparando fagocitose e quimiotaxia de leucócitos uterinos e sanguíneos de éguas suscetíveis e resistentes, verificaram que os leucócitos uterinos de éguas suscetíveis apresentaram maior fagocitose e quimiotaxia que os de éguas resistentes, quando incubados com um *pool* de plasma ou com plasma homólogo. As secreções uterinas, entretanto, tiveram reduzido poder opsonizante. Em conclusão, a fagocitose defeituosa realizada pelos neutrófilos uterinos em éguas suscetíveis seria resultado de disfunções na opsonização, ao invés de uma disfunção primária dos neutrófilos. Por outro lado, a fagocitose e a quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN) uterinos e sanguíneos de éguas suscetíveis foram maiores que as de éguas resistentes, quando utilizado como quimioatrativo o líquido uterino.

Mais recentemente, descobriu-se que as plaquetas têm importante interação com os neutrófilos no processo inflamatório. A fagocitose e a função respiratória dos neutrófilos, medidas através da quimiluminescência, foram potencializadas pela presença de plaquetas (Zalavary *et al.*, 1996). Elas também aderem ao endotélio lesado, liberando substâncias que ativam o sistema do complemento, atraiendo mais leucócitos (Roitt *et al.*, 1992). A apoptose foi impedida quando os neutrófilos foram

separados do sangue total utilizando a dextrose como gradiente de separação (Andonegui *et al.*, 1997).

2.2.4 Outros

a) Plasma Seminal

O plasma seminal eqüino vem sendo considerado como um fator extrínseco de defesa uterina da égua. No garanhão, ele se compõe das secreções do epidídimos, da ampola do canal deferente, da próstata, das vesículas seminais e das glândulas bulbo-uretrais (Tischner *et al.*, 1975). Seus componentes têm a função de proteger os espermatozóides contra agentes oxidantes e peroxidantes (Mann, 1975), além de atuar no metabolismo dos espermatozóides (Magistrini *et al.*, 1995).

O plasma seminal inibe a quimiotaxia dos neutrófilos *in vitro*. Como os espermatozóides são capazes de induzi-la através da ativação do complemento, a remoção do plasma seminal do sêmen congelado poderia explicar a maior reação inflamatória verificada após a inseminação artificial com sêmen congelado (Troedsson *et al.*, 1997).

Foi sugerido também que o plasma seminal induz as contrações vaginais e uterinas, facilitando assim a limpeza física e o transporte dos gametas até o oviduto (Katila, 1997). Em um trabalho comparando sêmen fresco, sêmen fresco incubado com plasma sanguíneo, sêmen congelado, sêmen congelado incubado com plasma sanguíneo, plasma seminal e plasma seminal incubado com plasma sanguíneo em câmaras quimiotáxicas, Troedsson *et al.* (1997) verificaram que praticamente nenhum neutrófilo migrou em direção ao plasma seminal, deduzindo que este tem um papel no controle da endometrite pós-cobertura. O sêmen, tanto fresco como congelado, provocou a quimiotaxia dos leucócitos em grande escala. Provavelmente a modulação da inflamação pós-cobertura pelo plasma seminal ocorre através da inibição do complemento. A retirada do plasma seminal dos ejaculados antes da inseminação artificial pode alterar a regulação normal dessa inflamação após a inseminação (Troedsson *et al.*, 2000). Em outro estudo, Troedsson *et al.* (1999) concluíram que a supressão da quimiotaxia dos leucócitos pelo plasma seminal se faz de forma dose-dependente. Também foram avaliadas três frações de proteínas do

plasma seminal de diferentes pesos moleculares: <10kDa, <50kDa e <100kDa. A maior supressão da quimiotaxia ocorreu com a fração de <100kDa, porém as demais frações moleculares também suprimiram a quimiotaxia. Os resultados de Fiala *et al.* (2002), comparando infusões uterinas de plasma seminal e de diluente (leite desnatado), em relação à inflamação uterina, mostraram que o plasma seminal e o diluente também podem provocar uma resposta inflamatória uterina. Após as infusões, o útero era lavado com 50mL de PBS para a contagem de neutrófilos obtidos. Ao ser usado o plasma seminal, a resposta inflamatória aumentou progressivamente até 4 horas após a infusão, quando um máximo de 236×10^6 leucócitos foram encontrados. Quando o diluente foi usado, a inflamação aumentou progressivamente até as 24 horas, com 468×10^6 leucócitos no lavado.

2.3 Influência do Ciclo Estral

Vários pesquisadores estudaram a influência do ciclo estral na susceptibilidade às endometrites na égua, analisando-a em relação aos demais mecanismos de defesa uterina.

Medindo as concentrações de imunoglobulinas, Asbury *et al.* (1980) e Mitchell *et al.* (1982) encontraram maiores concentrações de imunoglobulinas em lavados uterinos obtidos na fase de diestro, do que durante o estro. Já Watson e Stokes (1988) não encontraram diferença nas concentrações de imunoglobulinas nos lavados obtidos de éguas ovariectomizadas tratadas com estrógeno ou progesterona.

Para testar a influência da fase do ciclo estral sobre a quimiotaxia dos neutrófilos, testou-se o efeito do lavado uterino de éguas em estro ou diestro como agente quimiotático (Strzemienski e Kenney, 1984). A capacidade de atrair leucócitos foi a mesma para os lavados de estro ou diestro. Diferentemente, em um estudo com éguas ovariectomizadas, constatou-se que os leucócitos do sangue apresentaram elevada quimiotaxia sob influência da progesterona, enquanto o tratamento com estradiol a reduziu (Watson, 1988a).

O estrógeno tem importante ação na limpeza física do útero: promove a abertura da cérvix, essencial para a eliminação de fluidos do útero, bem como

favorece a contratilidade miometrial, como foi demonstrado através da eletromiografia por Troedsson *et al.* (1993c).

2.4 Diagnóstico da Endometrite Bacteriana

Diversos procedimentos semiológicos são utilizados para diagnosticar a presença de uma endometrite bacteriana. São eles:

2.4.1 Exame Clínico

Através da inspeção da genitália externa, pode-se analisar a conformação vulvar e a coaptação dos lábios vulvares. A conformação defeituosa em éguas facilita a entrada de contaminantes no trato genital externo (Caslick, 1937; Silva, 1983). Outra observação importante é a presença de secreção muco-purulenta na comissura ventral da vulva, nos pêlos da cauda e, muitas vezes, o acúmulo na região perineal (Malschitsky, 1998). As éguas que apresentam acúmulo de secreções na região perineal podem ser portadoras de inflamações uterinas (Caslick, 1937; Pascoe, 1979).

No diagnóstico de endometrite na égua, a palpação do útero seria de valor nos casos em que há grande acúmulo de líquido no lúmen uterino ou, também, para se perceber a mudança de tônus na ocorrência de inflamação. A palpação dos ovários determinaria a fase do ciclo estral, pois, durante o estro, os mecanismos de defesa celular e anticorpo-associado do endométrio equino (Watson, 1988b) são mais eficientes.

Excessivo acúmulo de líquido durante o estro, detectado ao ultra-som, pode ser associado à infecção uterina (Allen e Pycock, 1989). Através do ultra-som pode-se avaliar a quantidade de líquido acumulado no lúmen uterino durante a endometrite e a qualidade deste. Curnow (1991) atribuiu um escore para estes quesitos, com o volume (V) variando de 1 a 3, de mínimos para grandes acúmulos. A qualidade (Q) varia de 1 a 4, ou seja, de fortemente ecogênico a não ecogênico.

Através de um espéculo previamente flambado, se examina a área da vagina e a cérvix da égua; observa-se a abertura e a forma da cérvix, sua coloração e

umidade. No caso de endometrites, pode-se notar a presença de secreções no fundo de saco vaginal, hiperemia da mucosa, cérvix relaxada, aberta e hiperêmica (Mattos, 1989).

2.4.2 Exames Complementares

a) Citologia Endometrial

O primeiro a descrever a técnica para exame da citologia endometrial foi Knudsen (1964). Hoje, ela é prática corrente no auxílio ao diagnóstico da endometrite bacteriana. Consiste na observação, ao microscópio óptico, de um esfregaço obtido com a passagem de cefanete através da cérvix (Mattos *et al.*, 1984) para detectar a presença ou não de leucócitos polimorfonucleares. Estes só são encontrados se associados à inflamação (Ricketts e Wingfield-Digby, 1982). Vários pesquisadores divergem quanto à quantidade de células inflamatórias necessárias para se considerar um esfregaço positivo (Betsch, 1992). Freeman *et al.* (1986) consideram que todo o leucócito presente na luz do útero pode ser visto como sinal de endometrite. Couto e Hughes (1985) relacionam a presença dos polimorfonucleares ao número total de células e consideram a citologia positiva quando há uma proporção maior ou igual a 3% de neutrófilos sobre o total de células presentes. Mattos *et al.* (1984) afirmam que, na citologia endometrial de éguas sadias, não aparecem neutrófilos em qualquer fase do ciclo estral, exceto nas seguintes situações:

- a) em amostras coletadas logo após o parto;
- b) em amostras coletadas logo após a cobertura;
- c) em amostras coletadas nos primeiros cios após o anestro invernal.

A citologia é um método mais sensível que o exame bacteriológico no auxílio ao diagnóstico da inflamação endometrial, pois todas as éguas com endometrite clínica devem apresentar também o exame citológico positivo (Ricketts e Wingfield-Digby, 1982; Mattos *et al.*, 1984).

Kenney (1978) considera que a citologia endometrial permite apenas o diagnóstico da endometrite bacteriana, assim como Reiswig *et al.* (1993). Mattos *et al.* (1984) encontraram uma correlação entre achados citológicos e taxa de fertilidade

pois, em 206 éguas submetidas à inseminação artificial, apenas 5% das éguas portadoras de citologia positiva emprenharam.

b) Exame Bacteriológico

O exame bacteriológico foi considerado por Hughes (1978) como um meio auxiliar de diagnóstico, pois o fato de se obter bactérias na cultura não indica necessariamente endometrite. Ele deve sempre ser associado ao exame citológico e ao quadro clínico (Pimentel *et al.*, 1989). Allen e Newcombe (1979) dividiram as bactérias coletadas em três grupos: as oportunistas, como *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*; as de transmissão venérea, como *Klebsiella sp.* e *Haemophilus equigenitalis*; e os patógenos ocasionais, como *Pseudomonas* e fungos. Também discorreram sobre as técnicas de coleta, e concluíram que a introdução de um cefanete retrátil com a mão enluvada através da cérvix seria a técnica mais confiável.

Merkt e Von Leppel (1970) propuseram uma técnica simples, que consiste no uso da pinça de Albrechtsen para fixação da cérvix e da pinça de Merkt para a coleta propriamente dita, a qual protege o material de contaminação. O conjunto é introduzido na cavidade vaginal através de um espéculo de Polansky modificado previamente flambado. Posteriormente, foi adaptado à pinça de coleta um cefanete estéril (Merkt *et al.*, 1979).

Ball *et al.* (1988) desenvolveram uma técnica de coleta por lavagem com baixo volume de solução salina através de um catéter. Waelchli *et al.* (1992), no entanto, comparando a técnica de lavagem com a de coleta através de um especulo, em éguas cuja região vulvar era marcada por uma solução com *Escherichia coli*, concluíram que a contaminação das amostras pelo marcador era muito maior (22/24) com a técnica de lavagem do que com o auxílio de espéculo (3/12). Os resultados de Troedsson *et al.* (1995) em um trabalho com infecções experimentais, onde foi usada a técnica de coleta de Ball, apenas confirmam estes achados. Além disso, Castilho (1994), utilizando um grupo de éguas não-infectadas para controle da manipulação do ciclo estral e utilizando a técnica de Merkt *et al.* (1979), não encontrou contaminação em suas amostras, havendo tomado precauções de limpeza e esterilização do material.

2.5 Tratamento da Endometrite Bacteriana

Para o tratamento da endometrite aguda já foram propostas várias alternativas. Estas buscam, em princípio, eliminar os fatores predisponentes, refazendo as barreiras físicas contra as bactérias através de técnicas de vulvoplastia e/ou perineoplastia (Caslick, 1937; Götze, 1949; Pouret, 1982; Silva, 1983). Também tenta-se evitar a entrada de patógenos no útero através de técnicas de contaminação mínima, como a inseminação artificial, ou com uma boa higiene no caso da monta natural (Kenney *et al.*, 1975).

No caso de endometrites bacterianas, deve-se lançar mão de meios que provoquem a morte do agente, sejam eles o uso de antibióticos ou agentes que provoquem ativação dos mecanismos de defesa do endométrio equino, bem como promover a limpeza física do útero (Watson, 1988b).

2.5.1 Lavagem Uterina

A lavagem uterina é um meio eficiente de promover a limpeza física e a drenagem de conteúdos do útero. Com isto, facilita-se a ação de drogas ou antibióticos posteriormente administrados, os quais não agem satisfatoriamente na presença de pus e tecidos necróticos (Silva, 1989). A lavagem também promove um maior afluxo de imunoglobulinas e polimorfonucleares para o lúmen uterino (Asbury e Lyle, 1993).

As soluções usadas podem ser desde a solução salina a 0,9%, a qual permite a avaliação visual (Asbury & Lyle, 1993) e por espectrofotometria (Castilho *et al.*, 1995; Neves, 1998; Vieira *et al.*, 2002) da turvação do material recolhido, até soluções desinfetantes como iodo-povidona (Silva, 1989). No entanto, já foi relatado por Brinsko *et al.* (1990) que esta inibe a locomoção dos neutrófilos equinos *in vitro*, em concentrações de até 0,2%. Recomenda-se que a temperatura do líquido a ser infundido seja em torno de +40° C para produzir uma leve irritação no endométrio, a qual seria benéfica no sentido de produzir maior afluxo de polimorfonucleares (Asbury, 1990).

O volume ideal a ser infundido seria em torno de um litro (Mattos, 1989; Asbury & Lyle, 1993), embora em éguas multíparas já se tenha usado até cinco a seis litros (Asbury & Lyle, 1993).

Em um estudo envolvendo éguas infectadas experimentalmente, Castilho *et al.* (1995) e Mattos et al. (1997) analisaram, pela espectrofotometria, a turvação do líquido de 5 lavagens seqüenciais diárias, de 1 litro cada, realizadas até a cura bacteriológica. Concluíram que ao menos quatro lavagens consecutivas diárias, durante pelo menos três dias, são necessárias para promover uma limpeza uterina adequada.

Utilizando lavagens com 3 litros de salina, em um prazo de 4 a 6 horas após a cobertura em um grupo de éguas, Knutti *et al.* (1997) obtiveram uma taxa de prenhez maior do que no grupo controle, concluindo que lavagens uterinas feitas de 4 a 6 horas após a cobertura ou a inseminação não afetam negativamente a fertilidade.

2.5.2 Antibioticoterapia

A utilização da antibioticoterapia no tratamento das endometrites bacterianas na égua é controversa, pois o surgimento e o emprego dos antibióticos em nada afetou positivamente os índices de fertilidade eqüina através dos anos (Collins, 1964). Em um levantamento das taxas de parição da raça Hanoverana no período de 1815 a 1973, Merkt *et al.* (1979) não encontraram melhora nos índices reprodutivos, mesmo nos anos após a II Guerra Mundial, que coincidem com a disseminação do uso de antibióticos. Parte dessa ineficiência pode ser creditada ao uso incorreto e mal orientado dos antibacterianos, o que pode levar ao aparecimento de resistência bacteriana, infecções fúngicas e até mesmo de lesões do endométrio (LeBlanc *et al.*, 1989b). Eilts *et al.* (1988) investigaram o efeito de infusões uterinas de gentamicina, através de biópsias endometriais, em 9 éguas Puro Sangue de Corrida vazias do ano anterior. A inflamação transitória encontrada foi similar à de éguas que tiveram seu útero infundido com salina.

Para se eleger um antibiótico para tratar a endometrite, é preciso, em primeiro lugar, que a bactéria presente no útero possa ser considerada potencialmente patogênica. Esta deve ser devidamente isolada e identificada e, em caso positivo, deve-se proceder a um antibiograma (Davis e Abbit, 1977). É preciso também que a

presença de crescimento bacteriano em cultura seja compatível com o quadro clínico e citológico e a presença de infertilidade (Betsch, 1992).

Deve-se procurar, então, eleger a dosagem e a freqüência de tratamento, bem como o volume de antibiótico a ser infundido. Crê-se que infusões de antibióticos diluídos em volumes maiores alcançam uma área maior do endométrio (Jones, 1995) e tornam a absorção mais lenta do que a de medicamentos não diluídos. Isto é importante se se considerar que uma rápida absorção seria razão suficiente para uma administração de antibióticos mais freqüente do que o usual (Threllfall e Carleton, 1986). Em contrapartida, a infusão de grandes volumes de soluções antibióticas na égua em estro poderia causar refluxo através da cérvix aberta, havendo com isso subdosagem e desperdício do princípio ativo (Jones, 1995). Também pode-se utilizar a via sistêmica, evitando, assim, a contaminação decorrente de repetidas infusões (Ley, 1994).

2.5.3 Administração de Agentes Ecbólicos

Agentes ecbólicos são drogas que estimulam a contratilidade miometrial, tais como ocitocina (Goddard e Allen, 1984; Allen, 1991; Mattos *et al.*, 1999b e c); prostaglandina F_{2α} e seus análogos (Zimmer Jr., 1994; Combs *et al.*, 1996; LeBlanc, 1997); e metilergonovina (Zimmer Jr., 1994; Mattos *et al.*, 1995; Mattos *et al.*, 1999b).

A ocitocina sintética é fisiologica e quimicamente semelhante à endógena (Rall e Schleifer, 1987). A ocitocina induz uma resposta quase imediata, em torno de 60 segundos após a administração, e seu efeito dura cerca de 40 minutos (Combs *et al.*, 1996). Mais recentemente, Madill *et al.* (2002) propuseram o uso de administração intramuscular de ocitocina, visando uma aplicação mais segura no caso de o veterinário não se encontrar na propriedade. Utilizaram as dosagens de 5, 10, 20 e 40 UI. O tempo até o início da resposta variou de 5 a 22 minutos, com uma duração de 100 minutos. A duração da resposta foi maior para a dose de 40 UI, e menor para a de 5 UI, mostrando uma correlação entre dose e resposta. Os efeitos da administração endovenosa de ocitocina foram comparados com os de sua administração intra-uterina por Campbell e England (2002), que utilizaram, em ambos os casos, 30 UI. A administração endovenosa causou redução nas contrações

uterinas, enquanto o uso intra-uterino provocou aumento da contratilidade. Allen (1991), propôs que a ocitocina poderia ser usada após a cobertura para estimular a expulsão do conteúdo uterino e que isto não afetaria adversamente a fertilidade da égua. Durante o estro, há maior resposta à administração de ocitocina exógena, porque há mais receptores que se ligam à ocitocina no endométrio. LeBlanc *et al.* (1994a e b), em experimentos usando cintilografia para avaliar a expulsão de um radiocolóide previamente infundido no útero, observaram que todas as éguas, susceptíveis à endometrite ou não, eliminaram mais de 90% do radiocolóide do útero em trinta minutos, após uma injeção intravenosa de 20 UI de ocitocina. As éguas consideradas susceptíveis não conseguiram eliminar o radiocolóide na ausência do tratamento. Em outro estudo com cintilografia, Cadario *et al.* (1997) verificaram que éguas com limpeza uterina retardada eliminaram apenas 74% do radiocolóide do útero após a administração de ocitocina, enquanto as éguas consideradas resistentes eliminaram 94% do radiocolóide. Já Pycock e Newcombe (1996) preconizaram a dilatação manual da cérvixe após a administração intravenosa de ocitocina, para dar passagem ao conteúdo acumulado.

A ocitocina, em comparação com a PGF_{2α}, foi até 75% mais rápida em proporcionar a eliminação de um radiocolóide do útero (Combs *et al.*, 1996). Rasch *et al.* (1996), em um estudo envolvendo 56 éguas da raça Hanoverana, observaram que éguas que apresentavam líquido no lúmen uterino após a ovulação, obtiveram melhores taxas de prenhez com uma injeção pós-cobertura de ocitocina.

Von Reitzenstein *et al.*, em 2002, fizeram um experimento com o objetivo de verificar se a administração de detomidina em éguas tratadas com ocitocina interferiria no padrão de contratilidade uterina, bem como para avaliar estes padrões e se eles difeririam entre éguas normais e éguas com limpeza uterina retardada. A detomidina causou ondas de contrações em todas as éguas normais, porém só em duas éguas com limpeza uterina retardada. De um modo geral, a detomidina não aumentou a resposta à ocitocina nas éguas com limpeza uterina retardada, talvez devido ao fato de repetidas gestações afetarem o miométrio, fazendo com que estas éguas tenham um defeito intrínseco na contratilidade.

Em experimento realizado por Mattos *et al.* (1999c), a administração de ocitocina em éguas infectadas experimentalmente com *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* não teve efeito benéfico adicional nas éguas tratadas com infusão

uterina de plasma homólogo acrescido de leucócitos e injeção de 20 UI de ocitocina, em relação às éguas tratadas apenas com plasma. Também nas éguas tratadas apenas com injeção de ocitocina após a inoculação, a eliminação da bactéria não ocorreu em menos de 96 horas.

A prostaglandina F_{2α} e seus análogos, quando aplicados a partir do quinto dia pós-ovulação na égua, promovem a luteólise e, com isto, o retorno ao cio e o encurtamento do diestro (Asbury & Lyle, 1993). Também exercem efeito sobre a contratilidade miometrial (Irvine, 1993; Troedsson *et al.*, 1993c). Neste sentido, seu efeito é mais duradouro que o da ocitocina, durando cerca de 5 horas (Troedsson *et al.*, 1993c). Os objetivos desse tratamento seriam os mesmos que os da administração de estrógenos, acrescido do fato de que a prostaglandina, por si mesma, promove a contratilidade uterina (Troedsson *et al.*, 1995) mais lentamente, mas por um período maior que a ocitocina. Em um trabalho comparando a prostaglandina natural PGF_{2α} e as sintéticas fenprostalene e cloprostenol, administrados por via intramuscular, Combs *et al.* (1996) concluíram que o cloprostenol promovia a limpeza uterina mais eficaz. Até 75% do radiocolóide eram eliminados em 60 minutos após sua administração. A administração de PGF_{2α} e fenprostalene não produziu efeito em algumas éguas. O uso de prostaglandina parece benéfico em éguas com má drenagem linfática, pois as contrações prolongadas poderiam ser úteis em drenar a linfa para fora da parede uterina (LeBlanc, 1997). Sieme *et al.* (1997) infundiram dinoprost no útero de 131 éguas no momento da inseminação artificial. Este tratamento proporcionou melhores taxas de prenhez que o controle em éguas com idade acima de 8 anos e nas éguas vazias do ano anterior. Mais recentemente, Nie *et al.* (2002) hipotetizaram que a administração de cloprostenol no período periovulatório poderia causar insuficiência luteal e consequente morte embrionária precoce. No estudo realizado, porém, este efeito não foi detectado, embora não fossem utilizadas éguas susceptíveis.

Ocitócicos derivados dos alcaloides do ergot, como a metilergonovina, aumentam a atividade uterotônica e são correntemente utilizados em humanos para controlar hemorragias e aumentar o tônus uterino (Rall e Schleifer, 1987). A meia-vida da metilergonovina é de duas horas, mas há evidências de que seja seqüestrada em outros tecidos, o que contribuiria para uma ação terapêutica mais duradoura (Tepperman *et al.*, 1977).

Em trabalhos realizados visando diminuir o intervalo entre o parto e o cio do potro, Zimmer Jr. (1994) e Mattos *et al.* (1995) utilizaram a metilergonovina, porém seu uso não afetou os índices de concepção no cio do potro, embora haja antecipado a data da ovulação. Utilizando a metilergonovina no tratamento de éguas experimentalmente infectadas com *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, Mattos *et al.* (1999c), não encontraram diferença significativa em termos de cura bacteriológica entre a metilergonovina e o controle, provavelmente pela não disponibilidade de informações sobre a freqüência e a dosagem dos tratamentos, já que se trata de um medicamento de uso humano (Zimmer Jr., 1994).

2.5.4 Infusão Uterina de Plasma Homólogo

A infusão de plasma homólogo foi proposta por Asbury (1984), com a argumentação de que ela supriria o útero de fatores de opsonização nele deficientes. O autor propôs um protocolo de tratamento utilizando três lavagens uterinas seqüenciais com 1 litro de salina cada e, logo após, infusão de 100 ml de plasma homólogo durante 5 dias. De um grupo de 26 éguas com histórico de infertilidade e sinais clínicos de endometrite submetidas a esse tratamento, 24 não mostraram mais sinais clínicos de endometrite e 15 ficaram prenhas.

Adams e Ginther (1989) realizaram um tratamento comparativo em 43 éguas consideradas subférteis, envolvendo os seguintes grupos de tratamento: controle, infusão de salina e infusão de plasma durante quatro dias, e concluíram que a infusão de plasma não era eficaz para o tratamento da endometrite, pois não aumentou a taxa de prenhez obtida; porém, os mesmos admitem que a análise estatística ou o tamanho da amostra poderiam ser inadequados. Scott (1993), comparando cinco tratamentos com infecções experimentais, não encontrou redução do crescimento bacteriano em éguas tratadas com plasma homólogo, sendo os resultados similares aos do grupo controle.

Castilho (1994), utilizando o plasma homólogo no tratamento de éguas infectadas experimentalmente pelo *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, concluiu que este tratamento foi mais eficiente que a lavagem uterina e o controle, porém não mais do que o plasma autólogo acrescido de leucócitos. Em um estudo

comparando o plasma homólogo a infusões uterinas de penicilina ou prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e lavagem com solução salina, Troedsson *et al.* (1995) encontraram maior crescimento bacteriano 96h após a inoculação da bactéria nos tratamentos plasma autólogo e controle. Porém, uma única aplicação dos tratamentos, 12h após a inoculação, foi usada neste trabalho.

Utilizando plasma homólogo associado a infusões uterinas de penicilina e neomicina em 905 éguas PSC, Pascoe (1995) obteve melhores taxas de prenhez em éguas em lactação e vazias, quando comparado ao tratamento apenas com antibióticos. Mattos *et al.* (1997) testaram a infusão de plasma homólogo pós-cobertura em éguas virgens, vazias e lactentes e observaram que, em éguas vazias, este tratamento propiciou taxas de prenhez mais altas que o controle.

2.5.5 Infusão de Plasma Homólogo Acrescido de Leucócitos

Baseado no mecanismo celular de defesa uterina, Castilho (1994) desenvolveu um tratamento para endometrites bacterianas utilizando plasma autólogo acrescido de neutrófilos. Para chegar ao protocolo final do tratamento, foram realizados vários experimentos visando estabelecer o melhor método de separação dos neutrófilos do sangue total, verificar a quantidade de células separadas, sua viabilidade e sua capacidade fagocítica após a separação do sangue total, concluindo que o melhor método de separação era utilizar um gradiente osmótico com uma solução de dextrose a 6% (Castilho *et al.*, 1995).

Utilizando provas de fagocitose em placa, Castilho (1994) observou a capacidade fagocítica e, através da coloração pelo Azul Trypan (TBS), a viabilidade das células separadas, que foi de 92,6%. Estes resultados foram posteriormente confirmados com o uso da citometria de fluxo, quando Castilho *et al.* (1997) testaram a viabilidade e a capacidade fagocítica das células separadas do sangue total por meio da dextrose a 6%. No mesmo experimento, o tempo de sobrevida dos leucócitos após infundidos no útero e recuperados através de lavagem foi, em média, 6 horas. Este tratamento foi comparado, em éguas experimentalmente infectadas, com a infusão de plasma homólogo sem adição de leucócitos e com a lavagem com solução salina, sendo observado que o tempo da cura das infecções foi significativamente

menor para o grupo tratado com plasma com leucócitos (Mattos *et al.*, 1995a). Posteriormente, foi testado o uso do plasma homólogo acrescido de leucócitos em éguas infectadas experimentalmente, em comparação com drogas ecbólicas como a ocitocina e a metilergonovina (Mattos *et al.*, 1999c). O tempo de cura foi menor para o plasma, obtendo-se os mesmos tempos para o plasma associado à administração de ocitocina e plasma sem a associação de ocitocina.

Mattos *et al.* (1997) realizaram um estudo envolvendo 394 éguas subdivididas em virgens, vazias e com potro ao pé, e utilizaram o plasma com leucócitos como tratamento pós-cobertura, em comparação com plasma homólogo, plasma homólogo associado à antibioticoterapia e um grupo controle sem tratamento. As melhores taxas de prenhez foram verificadas no grupo onde se utilizou plasma acrescido de leucócitos em éguas vazias do ano anterior. Posteriormente, em um estudo com 342 ciclos estrais de 237 éguas, Mattos *et al.* (1999b) compararam o plasma com leucócitos, infundido logo após a cobertura, à injeção intravenosa de 20 UI de ocitocina associada a plasma com leucócitos 14 horas após, bem como apenas ocitocina, aplicada logo após a cobertura e 14 horas depois e controle. Os melhores índices de prenhez foram observados no grupo de éguas vazias do ano anterior quando tratadas com plasma acrescido de leucócitos.

Em 1997, Castilho *et al.* 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.

2.6 Criopreservação de leucócitos eqüinos

O primeiro a tentar a criopreservação de células sanguíneas foi Pegg (1965), que tentou congelar linfócitos, mas seu uso na pesquisa veterinária foi limitado (Truax *et al.*, 1990). Os crioprotetores mais utilizados são glicerol e DMSO, que protegem as células dos efeitos do congelamento e descongelamento. As células necessitam uma pronta diluição, pois os crioprotetores podem se tornar citotóxicos em temperaturas acima de 0° C (Pegg 1965; Truax *et al.*, 1990). Além disso, é necessário estabelecer uma curva de congelamento e descongelamento para que não

se formem cristais de gelo intracelulares ou haja danos irreversíveis à membrana celular (Castilho, 1998). A curva de congelamento para leucócitos utilizada neste trabalho foi adaptada por Castilho (1998) a partir de uma curva para congelamento de linfócitos já conhecida (Truax *et al.*, 1990).

2.7 Infecções Experimentais

Vários autores utilizaram infecções experimentais para testar tratamentos para endometrites bacterianas. Basicamente, busca-se introduzir no útero uma grande quantidade de um microorganismo causador de endometrites na égua. O *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* tem sido o mais usado, por ser a bactéria mais encontrada em casos de endometrites (Welsh, 1984). Entretanto, Hinrichs *et al.* (1992) utilizaram como inóculo a *Pseudomonas aeruginosa*, e King *et al.* (1998) a *Escherichia coli*.

A conservação da bactéria para posteriores infecções experimentais geralmente é feita por congelamento com um crioprotetor, como glicerol a 10% (Watson, 1988a; Widders *et al.*, 1995; King *et al.*, 1998; Castilho, 1994; Neves, 1998). De outro modo, Pycock e Allen (1990) mantiveram a bactéria repicando-a semanalmente em placas de ágar-sangue, que eram incubadas a +37°C por 24 horas e, após, mantidas sob refrigeração a +4°C.

O número de bactérias inoculadas varia entre autores. Asbury *et al.* (1980) utilizaram 50ml de *S. equi subsp. zooepidemicus* em caldo simples, incubando-os por 24 horas a +37°C. Todo o volume foi infundido no útero, sem preocupação com a quantidade de bactérias. Posteriormente, Cheung *et al.* (1985), Watson (1988a), Castilho (1994), Widders *et al.* (1995) e Neves (1998) padronizaram a quantidade de bactérias em 1×10^9 diluídos em 20ml de solução salina. Já Troedsson e Liu (1991), Troedsson e Liu (1992), Troedsson *et al.* (1993a) e Squires *et al.* (1992), utilizaram 5×10^6 diluídos em 30ml de salina.

2.8 Citometria de fluxo

O citômetro de fluxo permite analisar rápida e eficientemente grandes quantidades de células. O aparelho consiste de um sensor para medir características

ópticas das células e outras partículas, bem como de um computador para armazenamento e análise de dados (Castilho, 1998).

Para serem avaliadas pelo aparelho, as células devem estar suspensas em um fluido, geralmente solução salina fosfatada tamponada (PBS). Esta suspensão passa através de um tubo capilar, que leva à câmara de medição. Aí, são separados os agregados celulares, o que permite que cada célula seja atravessada por um feixe de raios laser. As células, então, emitem sinais de fluorescência que são detectados em 1024 canais por parâmetro, e armazenados para análise posterior. No caso de leucócitos, podem ser analisadas a vitalidade das células, a produção de radicais livres de oxigênio e sua capacidade fagocítica. Para cada uma destas análises é utilizado um corante que emite fluorescência à passagem dos raios laser. Para a análise da quimiotaxia e da vitalidade é utilizado o iodeto de propídio. Na análise da produção de radicais livres de oxigênio, é utilizado di-hidro-rodamina-123 (Castilho, 1998). Na análise da fagocitose, as bactérias são marcadas pelo isotiocianato de fluoresceína.

2.9 Quimiotaxia de leucócitos

Quimiotaxia é a migração direcional de células de acordo com o gradiente de concentração de determinado fator quimiotáxico. A liberação de fatores da inflamação, como o leucotrieno B4 (Watson, 1988a), fatores do complemento e produtos inflamatórios de células induzem a quimiotaxia (Kwon, 1987; Castilho, 1998).

Para a avaliação da quimiotaxia, foram propostos diferentes tipos de câmaras. Grimstad e Benestad (1982) utilizaram câmaras individuais com filtro de micropore, nas quais eram contados os leucócitos que chegavam à câmara inferior. Watson *et al.* (1987b), utilizaram a técnica de migração em placas de agarose, corando-as após a incubação e contando as células ao microscópio óptico. Vários pesquisadores utilizaram as câmaras de Boyden para estudar a quimiotaxia de leucócitos eqüinos (Liu *et al.*, 1985; Pycock e Allen, 1988; Troedsson *et al.*, 1993b; Barros, 1997; Troedsson *et al.*, 1999). Todos os autores coraram os filtros e contaram as células ao microscópio óptico.

As câmaras utilizadas por Zerbe *et al.* (2003) e Engelke *et al.* (1999), consistem de duas partes de acrílico, uma inferior e outra superior, cada uma das quais com dez poços sobrepostos, de uma membrana de silicone, com perfurações correspondentes aos poços nos componentes de acrílico e de uma membrana de policarbonato com poros de 3 μ m. Estas câmaras permitem fazer, ao mesmo tempo, dez replicações, ou utilizar dez quimioatraentes diferentes. Também permitem a contagem das células que migraram através da citometria de fluxo, bem como a verificação de sua vitalidade.

3.1 ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp. ***zooepidemicus***

Adriana Pires Neves¹, Andrea Keller¹, Cristina Rodrigues Trein¹, Gabriella Möller¹,
Maria Inês Mascarenhas Jobim¹, Luis Fernando Fiori Castilho¹; Marisa Ribeiro de
Itapema Cardoso¹; Wolfgang Leibold², Holm Zerbe², Erich Klug²,
Ricardo Macedo Gregory¹, Rodrigo Costa Mattos^{1a}

¹ REPROLAB, Departamento de Medicina Animal, FAVET – UFRGS – Av. Bento Gonçalves, 9090 91540-000 Porto Alegre –RS - Brazil

²- Tierärztliche Hochschule Hannover – Bischofsholer Damm 15 – 30173 Hannover,
Germany

^a Corresponding author: Tel/Fax: #55 51 3316 6124
e-mail: rcmattos@ufrgs.br

Abstract

This study compared four treatments for bacterial endometritis in mares experimentally infected with *Streptococcus zooepidemicus*. Twenty-five mares were used, twenty resistant and five susceptible to endometritis. Mares would be in estrus when infected. Twenty-four hours after inoculation, clinical, bacteriological and cytological examinations were performed and repeated until the first occurrence: negative cytology and no *Streptococcus* growth or the seventh day post-infection. All mares showed clinical signs of endometritis and were assigned to one of the following treatments: 1-intrauterine infusion of fresh leukocytes; 2-intrauterine infusion of frozen-thawed leukocytes; 3-intrauterine infusion of lysed leukocytes; 4-intrauterine infusion of recombinant human Interleukin-8 (rhIL-8); 5-Control. Mares were submitted to all treatments, with at least a fourteen-day interval between treatments in a Latin Square design. Treatment did not affect ($P = 0.121$) time needed for resistant mares to eliminate bacteria. Time needed for elimination of bacteria was similar in susceptible mares treated with fresh and frozen leukocytes ($P = 0.333$). Susceptible mares treated with frozen leukocytes also did not differ from those treated with lysed leukocytes ($P = 0.227$) for time to eliminate bacteria, but were significantly different ($P > 0.02$) from those treated with rhIL-8 and control. In resistant mares, physical clearance ability was probably the responsible for bacterial elimination. Intrauterine infusions in susceptible mares with viable or lysed leukocytes associated or not to opsonizing factors, reduced the time to elimination of bacteria. Infusions with bactericidal effect (functional neutrophil and granules) was likely effective and responsible for the more rapid elimination of bacteria in susceptible mares.

Keywords: mare, endometritis, plasma, leukocytes

1. Introduction

Bacterial infections of the genital tract are one of the major causes of infertility in mares (Hughes & Loy, 1975). *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* is the pathogen most commonly identified in endometrial swabs from mares with endometritis (Ferreiro et al., 1986; Timoney et al., 1986). This species has been used in most studies of uterine defense mechanisms (Welsh, 1984; Cheung et al., 1985; Watson, 1988; Castilho, 1994).

Mares with functional uterine defense are capable of eliminating bacterial contamination from the uterus within 36 to 48 hours. These mares are classified as resistant to chronic uterine infection. Mares that fail to clear the uterus from bacterial contamination are classified as susceptible to chronic uterine infection and are thought to have a compromised uterine defense (Troedsson, 1997). Susceptible mares appear to have an impaired electrical myometrial activity in response to intrauterine treatments (Troedsson, 1993). In addition, uterine neutrophils from susceptible mares have lesser phagocytic activity, probably as a result of negative effects of uterine secretions on phagocytosis. However, these neutrophils are fully functional if given an optimal environment (Troedsson et al., 1993).

Castilho (1994) proposed infusion of fresh homologous leukocytes as a treatment for bacterial endometritis. Mattos et al. (1999b and c) used this technique to treat mares experimentally infected with an infusion of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Infusion of homologous leukocytes was compared with infusion of homologous plasma, injection of ecbolic drugs (methylergonovine maleate and oxytocin), uterine flushing and untreated controls. Treatment with homologous plasma with leukocytes resulted in faster elimination of bacteria compared with other treatments. Treatment of mares with infusion of homologous plasma with leukocytes

after breeding increased pregnancy rates in barren mares (Mattos et al., 1997; Mattos et al., 1999a). Castilho et al. (1997) proposed cryopreservation of viable leukocytes as a method for storing immunocompetent leukocytes to be used as treatment of endometritis in mares.

Recent studies have demonstrated that uterine infusions of recombinant human interleukin-8 (rhIL-8) activate neutrophil migration in mares and cows. This model allows analysis of leukocyte migration under controlled conditions and may be a basis for simulations of different physiological and pathological conditions (Zerbe et al., 2003b).

The objective of the present study was to determine the effect of intrauterine treatments with cryopreserved leukocytes, fresh leukocytes, lysed leukocytes, and rhIL-8 on time needed for elimination of bacteria and normalization of endometrial cytology in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twenty-five mares with ages between 8 and 16 years were used. Mares were classified according to their uterine clearance ability as susceptible (eliminate bacteria in more than 96 hours) and resistant (eliminate bacteria in less than 96 hours) to bacterial endometritis. An endometrial biopsy was taken before the beginning of the experiment and used to classify twenty resistant mares to endometritis, of which four were classified as grade I, 10 as grade IIa and 6 as grade IIb, according to Kenney & Doig (1986). Five susceptible mares were classified as grades IIb (2 mares) and III (3 mares).

2.2. Bacteriological and cytological examinations

To obtain the endometrial samples, the mare's perineum was washed and the tail bandaged. A guarded swab (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) was passed through the cervix into the uterine lumen, via a sterile speculum (Merkt & Von Leppel, 1970). The swab was exposed into the uterine lumen to obtain an endometrial sample without contamination. The swab was retracted into the sheath, removed from the uterus and placed into a transport medium. A bacteriological culture was considered negative when no growth was observed on the blood-agar dish or insignificant contaminants were isolated. Another swab was taken immediately, in a similar manner, to make an endometrial smear for cytological examination (Mattos et al., 1984). The swab was rolled back on a clean microscope slide, fixed (Merckofix, Merck, Germany) and stained with "Diff-quick" (Panótico, Laborclin, Brazil). Cytology was considered negative when no PMN was detected in the slide.

2.3. Preparation of bacteria

The strain of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* used was isolated from a mare with clinical signs of endometritis. After isolation, bacteria were cultured in brain heart infusion (BHI) for 24 hours. Glycerol was added to the bacteria diluted in BHI. This solution was placed in 2.0 mL vials (Eppendorf do Brasil – São Paulo) and placed directly into a -20° C freezer. Before infusion, bacteria were thawed in a water-bath at 37° C, cultured in BHI for 24 hours (37° C) and seeded onto 100 mm blood-agar dishes (20 to 30 dishes). Dishes were incubated at 37° C for 24 hours to allow bacterial growth. Dishes were washed with PBS and bacterial colonies were carefully removed. The resulting bacterial suspension was

then filtered, to remove agar particles, and re-suspended in PBS to a final concentration of 1×10^9 bacteria/mL. The suspension was aliquoted into 20 mL vials and kept at 5°C until use.

2.4. Procedure for harvesting fresh leukocytes

Blood (300 mL) was collected from the jugular vein of the mare to be treated and drawn into a tube with 2,500 IU heparin (Liquemine, São Paulo, Brazil). After collection, 120 mL of a 6% dextrose (Dextrosol- Refinações de Milho Brasil, Itatiaia, Brazil) solution were added, modifying the separation gradient and maintaining the leukocytes in the plasma. Erythrocytes were allowed to settle spontaneously during 30 min in a water-bath at 37°C . The supernatant containing leukocytes (range 675×10^6 to 864×10^6) was then aspirated (120 mL) and infused into the uterus (Castilho, 1994).

2.5. Procedure for harvesting and freezing leukocytes

Blood (2000 mL) was collected from the jugular vein of each of the four donor mares. Each liter of blood was drawn into a siliconized 5 L Erlenmeyer flask containing 5000 IU heparin. Erythrocytes were lysed through addition of distilled water at 5°C (2 vol water:1 vol blood). Ten seconds later, the solution was diluted further by addition of double concentrated PBS (Dulbecco Instant, 9.55 g/l, Fa. Biochrom, Berlin, Germany) (2 vol PBS:1 vol blood). Leukocytes were then separated through centrifugation at 4°C (Cryofuge 8000- Heraeus-Christ GmbH, Osterode, Germany) for 12 minutes at 220 g. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in PBS at 1X concentration (2 vol PBS:1 vol pellet). For leukocyte washing, this material was centrifuged at 4°C for 12 minutes, at 220 g.

Erythrocyte lysis and leukocyte washing were repeated two or three times until a pellet containing only leukocytes was obtained, according to the observation in a Bürker chamber (Glaswarenfabrik K. Hecht, Sondheim, Germany). In the absence of erythrocytes, leukocytes were counted and re-suspended in heterologous equine plasma with 5% DMSO, in a final concentration of 200×10^6 leukocytes/mL. Cells were then packaged in equine semen freezing macrotubes (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) and frozen using a cell-freezing machine (Gefrierautomat Minidigicool- Fa. IMV- L'Aigle, France) at the following cooling rates: $1^\circ\text{C}/\text{min}$ from $+4^\circ\text{C}$ to -70°C ; $10^\circ\text{C}/\text{min}$ from -70°C to -140°C . Macrotubes were plunged into liquid nitrogen once temperature reached -140°C (Castilho et al., 1997). The leukocyte separation, dilution and packaging took approximately 3 hours and during this manipulation the leukocyte suspension was kept over ice in order to preserve cell vitality and lesser metabolism. After 2 weeks, some samples were thawed at 37°C during 1 minute in a water-bath. After thawing, the content of each macrotube was diluted in saline for analysis of vitality using flow cytometry.

After thawing 100 μL of cell suspension were transferred to the cytometry tubes (FACScan Tubes, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex- France) and 200 μL of propidium iodide (100 $\mu\text{l}/\text{mL}$, Calbiochem Novabiochem GmbH, Taunus, Germany) were added to each tube. The cells were then analyzed by flow cytometry (Castilho, 1998) (Fluorescence Activated Cell Analyzer - Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) to count live cells. Three thousand cells were analyzed in each sample. Propidium iodide penetrates through cell membrane lesions and binds to DNA. Live and dead cells can be distinguished by the emission of orange or red fluorescence (FL2 or FL3). Cell samples had a mean vitality of 95%.

2.6. Lysed leukocytes

Lysed leukocytes were obtained in the same way as frozen leukocytes. Cells were counted, diluted (200×10^6 leukocytes/mL) and placed directly into a -100° C freezer without cryoprotectant during 24 hours to cause cell lysis. Samples were then thawed at 37° C, evaluated to verify lysis, placed in macrotubes (800×10^6 lysed leukocytes) and frozen in liquid nitrogen.

2.7. rhIL-8

Recombinant human Interleukin-8 (Human IL-8, Bio-Concept GmbH - Umkirch, Germany) was diluted in PBS to a concentration of 25 ng/mL (Zerbe et al., 2003b), placed in macrotubes and plunged into liquid nitrogen.

2.8. Control

An inert substance with no bactericidal or chemoattractive effect was used. R3F medium [RPMI 1640 medium (Fa. Biochrom, Berlin, Germany) + Hepes 15 nmol/mL + L-Glutamine 2 nmol/L + NaHCO₃ 18 mmol/L+ 3% inactivated fetal calf serum] was placed in macrotubes and frozen in liquid nitrogen.

2.9. Experimental infections and treatments

Before each experimental infection, mares were examined for reproductive soundness, including evaluation of perineal conformation, palpation *per rectum* and ultrasound of the genital tract, vaginal examination with speculum, bacteriological cultures and cytology of the endometrium. Only clinically normal mares with negative cytology and negative cultures were used.

Time of estrus was synchronized in mares for every treatment with prostaglandin F_{2α} (Lutalyse 5 mg im – Pharmacia Brasil Ltda., São Paulo) so as to result in estrus and presence of a dominant follicle at the time of infection. When a dominant follicle (≥ 35 mm) was detected, mares were experimentally infected with 1 $\times 10^9$ *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* suspended in 20 mL PBS.

Clinical examinations of the genital tract, endometrial cytology and endometrial cultures were conducted daily on all mares, beginning one day after bacterial infusion. Treatments were started as soon as endometritis was clinically detected, i.e., relaxed and congested cervix, presence of fluid in the uterus and in the vagina and positive cytology (presence of PMNs). The following treatments were conducted: Fresh leukocytes: Infusion of 120 mL homologous plasma with approximately 750×10^6 fresh leukocytes (range of 675×10^6 to 864×10^6); Frozen leukocytes: infusion of 800×10^6 heterologous leukocytes, frozen, thawed and diluted in saline to a volume of 120 mL; Lysed leukocytes: infusion of 800×10^6 heterologous leukocytes, lysed, thawed and diluted in saline to 120 mL; rhIL-8: infusion of 100 ng Interleukin-8, frozen, thawed and diluted in saline to 120 mL; Control: infusion of frozen-thawed R3F medium diluted in saline to 120 mL.

Frozen treatment materials were color-coded using labels and kept in liquid nitrogen. The operator administering the treatment did not know which color corresponded to each treatment. Treatments were performed daily after clinical, bacteriological and cytological examinations until the first occurrence of: no growth in cultures from endometrial swabs or 4 days of treatment. Clinical, bacteriological (Merkt & Von Leppel, 1970) and cytological (Mattos et al., 1984) examination continued until the first occurrence of: seventh day post-infection, negative culture for *S. zooepidemicus* from endometrial swabs, or absence of neutrophils in cytology.

Soon after clinical, bacteriological and cytological examination, mares were administered the assigned treatment. On the seventh day, all mares received an intrauterine infusion of 5,000,000 IU penicillin G (Ariston Indústrias Químicas, São Paulo, Brazil).

A Latin Square design was used. As 25 mares were used and each one was submitted to the five treatments, a total of 125 treatments were obtained. New infections were performed no sooner than 14 days following complete elimination of bacteria previously inoculated. No mare was lost during the process.

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed using General Linear Model Procedure of SAS (Statistical Analysis System). The model included the main effects of mare, mare category (resistant or susceptible), treatment and sequences of experimental groups and the dependent variables of time required to eliminate bacteria after experimental infection, time between experimental infection and the first negative cytology and their interactions. Means were compared using Least Square Means.

3. Results

All mares showed clinical signs of endometritis 24 hours after inoculation with *Streptococcus*. All 125 treatments began immediately after the first clinical examination (i.e., 24 hours after the experimental infection). There was no significant difference ($P = 0.121$) among treatments concerning the time needed for resistant mares to eliminate bacteria (Table 1). Time needed for elimination of bacteria in susceptible mares treated with fresh and frozen leukocytes was similar (Table 1, $P =$

0.333). Susceptible mares treated with frozen leukocytes also did not differ from those treated with lysed leukocytes ($P = 0.227$) for time to clear bacteria. Treatment with fresh, frozen or lysed leukocytes reduced the time to elimination of bacteria in susceptible mares relative to control and treatment with rhIL-8 ($P < 0.002$, Table 1).

Time needed between the experimental infection and the first negative cytology in resistant mares treated with fresh leukocytes was less ($P < 0.018$) than in resistant mares treated with rhIL-8, lysed leukocytes or control (Table 2). The number of days to the occurrence of the first negative cytology after the experimental infection in resistant animals treated with frozen leukocytes did not differ significantly from that of resistant animals treated with fresh leukocytes ($P = 0.30$). Treatment with fresh leukocytes, frozen leukocytes and lysed leukocytes reduced the time required for normalization of cytology in susceptible mares ($P < 0.008$) in comparison with mares from the control group and treated with rhIL-8 (Table 2).

3. Discussion

In the present study, resistant mares treated with plasma containing fresh leukocytes eliminated bacteria in 2.0 days. These results were similar to those reported by Mattos et al. (1999b) in another group of resistant mares (1.9 days). In addition, the period of 2.6 days needed for susceptible mares treated with fresh leukocytes to eliminate bacteria was similar to the period of 2.7 days observed by Mattos et al. (1999c) in susceptible mares treated with fresh leukocytes.

Fresh leukocytes treatment was based on the therapeutic effect of neutrophil phagocytic activity (Castilho et al., 1997; Zerbe et al., 2003a), on bactericidal effect of proteins secreted by granulocytes (Faurschou & Borregaard, 2003), on plasma opsonizing factors (Engelke et al., 1999) and on chemotactic properties from

leukocytes (Faurschou & Borregaard, 2003) and blood plasma (Asbury, 1984). The same therapeutic effects were presented by frozen leukocytes, except the opsonizing and chemotactic properties from blood plasma. Treatments with lysed leukocytes was based on its strong chemoattractive activity (Neves et al., 2005) and, probably, on the bactericidal effect of leukocyte proteins. Treatments with rhIL-8 were based on its chemoattractive action (Engelke et al., 1999; Zerbe et al., 2003a). The control group received an inert substance with no bactericidal or chemoattractive effect.

Treatment did not affect time needed by resistant mares to eliminate bacteria. Probably, their physical clearance ability was responsible for the bacterial elimination. Reproductively normal mares are able to clear an intra-uterine inoculum of *Streptococcus* within 96 hours, whereas this does not occur in susceptible mares (Troedsson & Liu, 1991).

Treatment of susceptible mares with fresh or frozen leukocytes resulted in similar times to elimination of bacteria and more rapid elimination when compared with other treatments. The shorter time needed for bacterial elimination in the fresh leukocyte group is probably due to an additive effect of plasma opsonizing factors and viable phagocytic leukocytes (Mattos et al., 1999b). However, the lack of plasma opsonizing factors in mares treated with frozen leukocytes did not affect the time needed to eliminate bacteria, when compared with mares treated with fresh leukocytes. This similar time was probably due to the bactericidal action being performed by the functional neutrophils that were infused. Moreover, the separation of fresh leukocytes from whole blood with 6% dextrose likely decreased leukocyte apoptosis (Andonegui et al., 1997), and enhanced phagocytosis and respiratory burst due to the presence of platelets (Zalavary et al., 1996). The Major Histocompatibility Factor Class I (MHC-I) expressed by live neutrophils (Potter & Harding, 2001)

probably allowed T-cells and macrophages to enhance bacterial elimination.

Susceptible mares treated with lysed and with frozen leukocytes did not show significant difference in the time needed for bacterial clearance. The proteins might be present in granules of lysed leukocytes, such as myeloperoxidase, alpha-defensins, lactoferrin and lysozyme, facilitating elimination of bacteria through the bactericidal effect, even after cell degranulation (Faurschou & Borregaard, 2003).

Susceptible mares treated with rhIL-8 eliminated bacteria in a period of time similar to that of control mares, and greater than that of mares treated with fresh, frozen and lysed leukocytes. Recombinant human IL-8 is considered an excellent chemoattractant (Zerbe et al., 2003b; Engelke et al., 1999). However, in the present study this effect was not observed. These results are confirmed from those of Keller et al. (2004), where neutrophilia were not observed in biopsies from susceptible mares 5 days after infection. A possible explanation for the greater time needed for mares treated with rhIL-8 to eliminate bacteria would be the difference between its effect *in vivo* and *in vitro* (Zerbe et al., 2003b) In this previous study *in vivo* modulation of neutrophils was affected by mediators other than rhIL-8, which are secreted by uterine cells and not present *in vitro*. Leukocytes also have the function of presenting antigens and expressing cytokines such as MHC-I (Potter & Harding, 2001). According to Zerbe et al. (2003b), uterine leukocytes attracted by rhIL-8 had lesser MHC-I. The lesser action of T-cells and macrophages could be responsible for the lesser effect of rhIL-8 seen in the present study.

The control group had the longest times for normalization of bacteriology and cytology. Elimination of bacteria in susceptible mares occurred on average in 6.2 days. This is similar to the results reported by Mattos et al. (1999c) in the untreated mares (7.1 days).

In the present study, uterine infusions with bactericidal effect (functional neutrophils and granules), opsonizing effect (plasma) and chemoattractant effect (neutrophils, plasma, cellular debris and IL-8) were performed in resistant and susceptible mares. No treatment was effective in resistant mares; the physical clearance ability was likely responsible for bacterial elimination. In susceptible mares, bactericidal action was likely effective and responsible for the more rapid elimination of bacteria. Opsonizing factors were used only in the group treated with fresh leukocytes, which eliminated bacteria more rapidly than others. The infusion of blood plasma as a thawing agent for frozen and lysed leukocytes could provide a more efficient opsonization, allowing frozen or lysed neutrophils to promote a more rapid bacterial elimination.

References

- Andonegui, G., Trevani, A.S., López, D.H., Raiden, S., Giordano, M., Jennifer, J.R., 1997. Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. *The Journal of Immunology* 158, 3372-3377.
- Asbury, A.C., 1984. Uterine defense mechanisms in the mare: the use of plasma in the management of endometritis. *Theriogenology*, 21, 387-393.
- Castilho, L.F.F., 1994. Endometrites na égua: plasma autólogo acrescido de leucócitos como forma de tratamento. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, 92p.
- Castilho, L.F.F., Zerbe, H., Rabe, U., Leibold, W., Klug, E., 1997. Isolierung und Gefrierkonservierung von immunokompetenten polymorphkernigen Neutrophilen Granuloziten zur Endometritisbehandlung beim Pferd. *Pferdeheilkunde*, 13, 437-444.
- Castilho, L.F.F., 1998. Untersuchung zur Separation, Gefrierkonservierung und Applikation von zirkulierenden polymorphkernigen neutrophilen Granuloziten zur Behandlung der Gebärmutterhautentzündung beim Pferd. Dissertation - Klinik für Pferde, 109p.
- Cheung, A.T.W., Liu, I.K.M., Walsh, E.M., Miller, M.E., 1985. Phagocytic and killing capacities of uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis. *Am. J. Vet. Res.* 46, 1938-1940.
- Engelke, F., Zerbe, H., Klug, E., Leibold, W., 1999. A new model system for endometritis in mares – preliminary results. *Pferdeheilkunde*. 15, 579-583.
- Faurschou, M., Borregaard, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*. 5, 1317-1327.
- Ferreiro, L., Ferreiro, C.L.R., Mattos, R.C., Flores, W.N., Pansard, H.S., Oliveira,

- L.M.S., 1986. Flora microbiana do conteúdo uterino de éguas PSI e Quarto-de-Milha a partir de swabs cervicais obtidos no período de 1984-1986 em haras do RS, PR e SP. Arq. Fac. Vet.-UFRGS. 14, 45-56.
- Hughes, J.P., Loy, R.G., 1975. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. Equine Vet. J. 7, 155-159.
- Keller, A., Neves, A.P., Aupperle, H., Steiger, K., Schoon, H.-A., Klug, E., Gregory, R.M., Mattos, R.C., 2004. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. Acta Scientiae Veterinariae. 32, 215-223.
- Kenney, R.M., Doig, P.A., 1986. Equine endometrial biopsy. In: Morrow DA, editor Current Therapy in Theriogenology 2. Philadelphia: WB Saunders., pp.723-736.
- Mattos, R.C., Mattos, R., Mattos, A.L.G., Gunzel, A.R., Klug, E., 1984. Bakteriologische und zytologische Untersuchungen von Uterusabstrichen beim Pferd. Der Praktische Tierarzt. 65, 809-814.
- Mattos, R.C., Malschitzky, E., Mattos, R., Gregory, R.M., 1997. Effects of different postbreeding treatments on fertility of Thoroughbred mares. Pferdeheilkunde. 13, 512-515.
- Mattos, R.C., Meirelles, L.S., Malschitzky, E., Castilho, L.F.F., Neves, A.P., Mattos, A.L.G., Vieira, M.J., Keller, A., Hött, A.K., Gregory, R.M., 1999a. Oxytocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of postbreeding endometritis in the horse. Pferdeheilkunde. 15, 584-587.
- Mattos, R.C., Castilho, L.F.F., Malschitzky, E., Mattos, R., Gregory, R.M., 1999b. Treatment of endometritis of experimentally infected mares: I- effect of lavage, plasma and leukocytes on uterine bacterial clearance. Arq. Fac. Vet.-UFRGS. 27, 49-60.

- Mattos, R.C., Neves, A.P., Gregory, R.M., Gomes, M.J.S., Mattos, R., Meirelles, L.S., Lagares, M.A., Keller, A., Wald, V.B., Vieira, M.J., Hött, A.K., 1999c. Treatment of endometritis of experimentally infected mares: II-effect of ecbolic drugs and plasma enriched with leukocytes on uterine bacterial clearance. Arq. Fac. Vet.-UFRGS. 27, 61-72.
- Merkt, H., Von Leppel, J.F., 1970. Die Entnahme von Proben für die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie Behandlungshinweise. Deutsch Tierärztliche Wochenschrift. 77, 489-528.
- Neves, A.P., Keller, A., Zerbe, H., Leibold, W., Klug, E., Gregory, R.M., Mattos, R.C., 2005. Evaluation of chemotaxis, vitality and generation of reactive oxygen species (ROS) of fresh, frozen and lysed equine leukocytes. Animal Reproduction, submitted.
- Potter, N.S., Harding, C.V., 2001. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. The Journal of Immunology. 167, 2538-2546.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., Berlough, J.E., 1986. The genus Streptococcus. In: Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. Constock Publishing Assoc., Ithaca, NY., Ch. 19, pp.181-187. 8.ed.
- Troedsson, M.H.T., 1993. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. J. Reprod. Fertil. 99, 307-313.
- Troedsson, M.H.T., 1997. Diseases of the uterus. In: Current therapy in equine medicine 4, Robinson NE (Ed.), WB Saunders Co. pp. 517-524.

- Troedsson, M.H.T., Liu, I.K.M., 1991. Uterine clearance of non-antigenic markers (^{51}Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 44, 283-288.
- Troedsson, M.H.T., Liu, I.K.M., Thurmond, M., 1993. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. *Biol. Reprod.* 49, 507-514.
- Watson, E.D., 1988. Uterine defence mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. *Eq. Vet. J.* 20, 397-400.
- Welsh, R.D., 1984. The significance of *Streptococcus zooepidemicus* in the horse. *Eq. Practice.* 6, 7-16.
- Zalavary, S., Grenegard, M., Stendahl, O., Bengtsson, T., 1996. Platelets enhance FC-(receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. *J. Leuk. Biol.* 60, 58-68.
- Zerbe, H., Castilho, L.F.F., Engelke, F., Mattos, R.C., Schuberth, H.J., Klug, E., Leibold, W., 2003a. Isolation and cryopreservation of functionally competent equine leukocytes. *J. Vet. Med.* 50, 179-184.
- Zerbe, H., Schuberth, H.-J., Engelke, F., Frank, J., Klug, E., Leibold, W., 2003b. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology.* 60, 209-223.

Table 1

Length of time (days) between experimental infection and the first bacteriological negative culture (no growth or insignificant contaminant isolates) in resistant and susceptible mares experimentally infected and submitted to different treatments

Treatment	Resistant Mares			Susceptible Mares		
	Treated	Mean days ±		Treated	Mean days ±	
	mares (n)	SD		mares (n)	SD	
Fresh leukocytes	20	2.0 ± 0.97 ^a		5	2.6 ± 0.89 ^a	
Frozen leukocytes	20	1.9 ± 1.23 ^a		5	3.4 ± 1.14 ^{ab}	
Rh-Interleukin-8	20	2.5 ± 1.61 ^a		5	6.0 ± 1.58 ^c	
Lysed leukocytes	20	2.8 ± 1.47 ^a		5	4.4 ± 0.89 ^b	
Control	20	2.7 ± 1.41 ^a		5	6.2 ± 2.05 ^c	

^{a,b,c} ($P < 0.05$) different characters indicate significant difference in the column

Table 2

Length of time (days) between experimental infection and the first negative cytology (absence of PMNs) in resistant and susceptible mares submitted to different treatments

Treatment	Resistant Mares			Susceptible Mares		
	Treated	Mean days ±		Treated	Mean days ±	
		mares (n)	SD		mares (n)	SD
Fresh leukocytes	20	2.7 ± 1.25 ^a		5	4.2 ± 0.83 ^a	
Frozen leukocytes	20	3.2 ± 1.37 ^{ab}		5	4.2 ± 1.09 ^a	
Rh-Interleukin-8	20	3.9 ± 1.83 ^{bc}		5	8.4 ± 2.4 ^b	
Lysed leukocytes	20	4.1 ± 1.69 ^{bc}		5	5.8 ± 0.83 ^a	
Control	20	4.2 ± 1.41 ^c		5	7.8 ± 2.05 ^b	

^{a,b,c} ($P < 0.05$) different characters indicate significant difference in the columns

3.2 ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

In vitro evaluation of chemotaxis, vitality and generation of reactive oxygen species of fresh or frozen equine leukocytes to be used as treatment of endometritis

A. P. Neves¹, A. Keller¹, H. Zerbe²; W. Leibold³, E. Klug⁴, R. M. Gregory¹,
R.C.Mattos^{1a}

1-REPROLAB, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av Bento Gonçalves 9090, 91540-000 Porto Alegre, Brazil

2-Tierärztliche Hochschule Hannover- Clinics for Obstetrics and Bovine Gynecology

3- Tierärztliche Hochschule Hannover- Immunology Research Group

4- Tierärztliche Hochschule Hannover- Equine Clinic

^a Corresponding author: REPROLAB, Depto. de Medicina Animal, av. Bento Gonçalves, 9090-91540-000 Porto Alegre – RS
Tel/Fax: #55 51 3316 6124
e-mail: rcmattos@ufrgs.br

Abstract

This study aimed to determine the chemotactic effect of different leukocyte diluents, of dextrose concentrations associated or not to rhIL-8, of lysed leukocyte concentration, and blood plasma source and concentration (homologous vs. heterologous) on fresh equine leukocytes vitality *in vitro*, and to verify the effect of two post-thawing extenders (Phosphate Buffered Saline - PBS - or Saline) on vitality and generation of Reactive Oxigen Species (ROS) by frozen leukocytes. These experiments were conducted as a part of the development of a cryopreservation protocol for equine leukocytes to be used as a treatment for endometritis. Assays were conducted using acryl chemotactic chambers incubated at 37°C. After incubation leukocytes were analyzed by flow cytometry. The percent of migrating cells did not differ with different concentrations of dextrose. There was no interaction between leukocytes diluents and dextrose concentrations. No difference between homologous and heterologous plasma was found. However, an interaction between different plasma types and plasma concentrations was observed. Chemotactic effect of lysed leukocytes was directly related to their concentration. The relative amount of live leukocytes after thawing was greater when there was incubated in PBS than in saline. However, no interaction was found between the period of incubation and the post thawing extender. Generation of ROS was not different between PBS and saline. There was no interaction between extenders and their dilutions rates. Concluding, dextrose was not a strong chemoattractant for equine leukocytes; 10%, 30% and 60% homologous plasma was a good chemoattractant. Lysed leukocytes and 10%, 30% and 60% homologous plasma had

similar chemotactic effect. Cells diluted in PBS and saline showed similar vitality and ROS generation in the post-thaw tests, when incubated for 15 minutes.

Keywords: equine, leukocytes, freezing, vitality, chemotaxis

Introduction

Bacterial infection of the genital tract has been recognized as an important cause of infertility in the mare (Hughes & Loy, 1975). The ability of maintaining a uterine environment compatible with embryonic and fetal life is essential for reproductive efficiency in equines. However, the uterine environment is easily disturbed by an inflammatory process following bacterial invasion (Asbury & Lyle, 1993), which can occur during breeding, genital examination and parturition (Ricketts & Mackintosh, 1987). Mares that eliminate contamination easily are called resistant to endometritis. Conversely, mares that fail to eliminate contaminants develop persistent uterine inflammation, being called susceptible to endometritis (Hughes & Loy, 1975; Kenney et al., 1975). Mares susceptible to post-breeding endometritis are also susceptible to persistent bacterial endometritis (Troedsson et al., 1997)

Current treatment protocols for bacterial endometritis involve the rapid removal of contaminant and inflammatory debris from the uterine lumen by uterine lavage or by pharmacological induction of myometrium contraction. Uterine infusions of fresh homologous plasma with leukocytes, using a 6% dextrose solution to allow the presence of leukocytes in plasma, in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* showed a more rapid bacterial elimination than untreated mares or treated with infusions of homologous blood plasma or ecbolic drugs (Castilho, 1994; Mattos et al., 1999a; c). These results were attributed to an increased uterine phagocytic activity due the infused phagocytes and opsonizing factors present in homologous plasma. However, a chemotactic effect might have been influenced these results. The releasing of by-products from lysed leukocytes or the dextrose solution is suggested to be involved.

However, due to some practical limitations in the manipulation of fresh leukocytes a method for cryopreservation of leukocytes was developed by Castilho *et al.* (1997), providing *in vitro* viable and functionally competent neutrophils for therapeutic use in mares susceptible to endometritis after thawing in phosphate buffered saline (PBS). The use of cryopreserved leukocytes to treat mares with endometritis is still not related.

Diluted recombinant human interleukin-8 (rhIL-8) in R3F cell culture medium demonstrated to have a chemotactic activity for equine neutrophils in transmigrations assays (Zerbe *et al.* 2003b). Similarly, the intrauterine infusion of rhIL-8 (25ng/mL) induced neutrophils influx into the mare uterus. The author concluded that the *in vitro* system can be very useful for complementary and detailed analysis of selected mediators and cell populations such as polymorphonuclear neutrophil granulocytes (PMN).

The objectives of these studies were to determine the chemotactic effect of different leukocyte diluents, of dextrose concentrations associated or not to rhIL-8, of lysed leukocyte concentration, and of blood plasma source and concentration (homologous vs. heterologous) on fresh equine leukocytes vitality *in vitro*, and to verify the effect of two post-thawing extenders (PBS or Saline) on vitality and generation of ROS by frozen leukocytes. These experiments were conducted as a part of the development of a cryopreservation protocol for equine leukocytes to be used as a treatment for endometritis.

Materials and Methods

Animals

Seven clinically healthy non-pregnant crossbred mares aging between 4 and 10 years old, with good body condition score and weighing between 450 to 650 kg were used. Mares were kept in open stalls and fed twice a day with mixed grass hay and concentrate.

General procedures

Separation of leukocytes

Blood was collected from each mare, into a heparinized container. Erythrocyte lysis and washing was performed to separate leukocytes. Erythrocyte lysis was conducted by adding distilled water at 5°C, to whole blood (2:1 v/v); followed 10 seconds later by addition of PBS (Dulbecco Instant, 9.55g/l, Fa. Biochrom, Berlin, Germany) in double concentration to the diluted blood solution (2:1 v/v). The blood diluted in PBS was then centrifuged (220 x g) at 4°C for 12 minutes (Cryofuge 8000- Heraeus-Christ GmbH, D-33660, Osterode, Germany). The supernatant containing erythrocyte debris was discarded and the pellet re-suspended with PBS (2:1 v/v). This procedure was repeated two to three times until a cell suspension containing only leukocytes was obtained, as observed in a Bürker (K. Hecht, Sondheim, Germany) counting chamber. In the absence of red blood cells, leukocytes were counted and re-suspended for immediate use in PBS or R3F [medium composed of RPMI 1640 medium (Fa. Biochrom, Berlin, Germany) + Hepes 15nmol/mL + L-Glutamin 2nmol/L + NaHCO₃ 18mmol/L] without antibiotics, with 3% inactivated fetal calf serum.

Cryopreservation of equine leukocytes

For cryopreservation, cells were re-suspended in heterologous equine plasma with 5% DMSO, to a final concentration of 200×10^6 leukocytes/mL. Immediately after final dilution, leukocytes samples were placed in macrotubes (Minitüb GmbH, Hauptstrasse 41 - 84184 – Tiefenbach, Germany) and frozen at the following cooling rates: from +4°C to -70°C = 1°C/min; from -70°C to -140°C = 10°C/min; and from -140°C to -196°C, plunged into liquid nitrogen, using a semen freezing machine (Gefrierautomat Minidigicool- Fa. IMV- L'Aigle, France) (Castilho *et al.*, 1997).

Chemotactic assays

Assays were conducted using acryl chemotactic chambers (Cytogen - Dieselstrasse 7 - 61239 - Ober-Morläw, Germany). The chambers consisted of two compartments, a lower and an upper one, each of them with ten corresponding wells. A silicon membrane separated compartments allowing communication between them. Compartments were also separated by a polycarbonate filtering membrane, with 3µm pores (Nucleopore Track-Etch membrane - Corning, Corning, NY, USA), through which cells could migrate. The solution to be tested for chemotactic activity was poured into the lower wells, which had 415µL capacity. The fresh leukocytes suspension to be attracted by chemotaxis was poured into the upper wells, which had 200µL capacity. The chambers were incubated at 37°C (Heraeus-Christ GmbH, Hanau, Germany) with 5% CO₂ for 2 hours.

Measurement of leukocyte vitality

After incubation, the content of each upper and lower corresponding well was stirred, 100µL of each mixture were transferred to the cytometry tubes (FACScan

Tubes, Becton Dickinson Labware Europe, 38241 Meylan Cedex- France) and 200µL of propidium iodide (100µl/mL, Calbiochem Novabiochem GmbH, Liztweg 1, Bad Soden, Taunus, Germany) were added to each tube. The tubes were then analyzed by flow cytometry (Castilho, 1998) (Fluorescence Activated Cell Analyser - Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) to count live migrating and non-migrating cells. The number of live cells in the lower well was divided by the total number of cells added in the upper well, resulting in the percent of migrating cells. Three thousand cells were analyzed in each sample. Propidium iodide penetrates through cell membrane lesions and binds to DNA. Live and dead cells were distinguished by the emission of white or red fluorescence (FL2 or FL3).

Measurement of the ROS generation

After thawing, cells were incubated for 15 minutes at 37°C, in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and, thereafter they were stimulated by the addition of 300nmol/L PMA (Phorbol-12-myristic-13-acetate-Sigma, Deisenhofen, Germany) and gently stirred. Cells were reincubated for 15 minutes, for PMN activation. After re-incubation, 5µL of dihydrorhodamin-123 (DHR-123 -Mobitec, Göttingen, Germany), a substance retained by PMN, were added. Myeloperoxidase, a product of the oxygen metabolism, acted catalyzing the oxidation of DHR-123, turning it into Rodamin-123, which is fluorescent. Neutrophils green fluorescence intensity was used to evaluate production of ROS. Two thousand cells of each sample were analyzed by flow cytometry.

Experiment 1: Influence of different concentrations of dextrose associated or not to rhIL 8 on the chemotaxis of equine fresh leukocytes.

Leukocytes were separated as mentioned above. Cell vitality used in this experiment, measured by flow cytometry, was > 95%.

A 2x4x2 factorial design was used. Main factors were leukocyte diluents (PBS, R3F), dextrose concentration (0%, 1%, 2% and 6%), and rhIL-8 concentration (0µL, 100µL). Two hundred microliters solutions containing 0%, 1%, 2% or 6% dextrose (Müller's Mühle Traubenzucker, MN GmbH, 45801 Gelsenkirchen, Germany) with or without 100µL rhIL-8 (Bio-Concept GmbH- Umkirch, Germany), were placed in each lower well. The remaining space was completed with Percoll. This procedure was conducted twice and 16 wells were filled. The 16 upper wells were filled with 200 µL of a solution with 2×10^6 leukocytes, diluted in either PBS (8 wells), or R3F (8 wells). The generalized linear model procedure of SAS was used for statistical analysis. The model included the following main effects: donors, diluents, dextrose and rhIL-8 concentration and their interactions. The dependent variable was leukocyte migration. Differences between means were considered significant at $p<0.05$. SAS for Windows 6.12 was the software used.

Experiment 2: Influence of different concentrations of homologous and heterologous blood plasma on chemotaxis of equine fresh leukocytes

Leukocytes of two non-pregnant mares were used in this experiment. Main factors studied were plasma type (homologous, heterologous) and plasma concentration (3%, 5%, 30%, 60%, 90%). Separation of leukocytes was done as described earlier. Vitality of leukocytes used was greater than 95% (range between 95% and 98%). To evaluate chemotaxis 200µL of solutions containing 3%, 10%, 30%, 60% and 90% of homologous or heterologous plasma diluted in distilled water were poured in each lower well. The remaining volume was completed with Percoll.

Positive controls were included for each plasma type consisting of 3% plasma, 100 μ L rhIL-8 (25ng/mL), and Percoll as a diluent. All samples and controls were run in duplicates. Each upper well was filled with 2×10^6 leukocytes diluted in 200 μ L PBS.

Quadratic regression was used for statistical analysis. The model included the main effects plasma source (homologous vs. heterologous), plasma concentration and their interactions. The dependent variable was leukocyte migration. Differences between means were considered significant at $p<0.05$. The software used was Minitab for Windows 11.1.

Experiment 3: Influence of the number of lysed leukocytes on the migration of equine fresh leukocytes

Leukocytes of two non-pregnant mares were used in this experiment. Separation of leukocytes was performed as described earlier. Vitality of leukocytes was greater than 95% (range between 96% and 99%). Leukocyte lysis was achieved by freezing cells at -100°C without cryoprotectant. After 24 hours, samples were thawed at 37°C and resuspended in PBS, to the desired concentration.

To evaluate chemotaxis, lower wells were filled with 300 μ L of a PBS solution containing 0.4×10^6 , 2.0×10^6 or 10.0×10^6 lysed leukocytes. An additional well was filled with 300 μ L rhIL-8 (25ng/mL), as a positive control. Percoll was used to complete wells volume. Samples were run in duplicates. Two hundred microliters PBS containing 1.2×10^6 leukocytes were put into upper wells and the chemotaxis was assayed as described earlier. The generalized linear model procedure of SAS was used for statistical analysis. The model included the main effect concentration of lysed leukocytes and the dependent variable leukocyte migration. Differences

between means were considered significant at $p<0.05$. SAS for Windows 6.12 was the software used.

Experiment 4: Influence of two different post-thawing media (PBS and saline) and four leukocytes dilutions on vitality and ROS generation in cryopreserved equine leukocytes.

Leukocytes from all mares were pooled and frozen in macrotubes as described above. Samples from six different batches were randomly thawed at 37°C for 1 minute in water-bath. After thawing, cell suspension ($200 \times 10^6/\text{mL}$ leukocytes) was diluted in either PBS or saline using the following dilutions: 1:50, 1:25, 1:12.5, and 1:6.25.

The samples were incubated in a microtiter plate with round bottom (Nunc, Wiesbaden Germany). To assess leukocyte vitality, half the samples were incubated at 37°C, with 5% CO₂, for 15 minutes, and the remaining were incubated for 120 minutes. To assess ROS production, incubation lasted 15 minutes.

Analysis of variance was used. The software used was Minitab for Windows 11.1. The model included the main effects dilution medium and leukocyte dilution and the dependent variables leukocyte vitality and ROS production. Differences were considered significant at $P<0.05$.

Results

Figure 1-

Donor did not influence leukocyte migration ($P=0.73$). Leukocytes diluted with R3F had greater ($P<0.01$) leukocyte migration than leukocytes diluted in PBS (Fig 1A). Interactions between medium and rhIL-8 ($P=0.45$), and between medium and dextrose concentration ($P=0.79$) were not significant, indicating that varying concentrations of rhIL-8 and of dextrose did not change the medium effect.

Presence of rhIL-8 increased migration of leukocytes ($P<0.01$, Fig. 1B). Similarly, different dextrose concentrations influenced the number of leukocytes found in the lower chamber ($P=0.02$). There was no interaction between presence of rhIL-8 and dextrose concentrations ($P=0.07$) on migration of leukocytes.

The influence of different source of plasma (homologous vs. heterologous), and plasma concentration on migration of equine leukocytes and the influence of rhIL-8 with 3% of the two kinds of plasma are shown on Fig. 2.

Figure 2

Source of plasma (homologous vs. heterologous) did not affect migration of leukocytes ($P<0.39$, Fig. 2A). However, different concentrations of plasma influenced considerably ($P<0.005$) leukocyte migration, and an interaction between the two types of plasma and different concentrations ($P=0.04$) on leukocyte migration was found. Using quadratic regression analysis, a high correlation ($R^2=0.75$) between plasma concentration and leukocyte migration was observed.

Fig. 2B shows that the presence of rhIL-8 increased migration of leukocytes ($P<0.01$). Source of plasma (homologous vs. heterologous) at 3% concentration did not affect migration of leukocytes ($P=0.94$) in the presence of rhIL-8.

Figure 3

Concentration of lysed leukocytes increased migration of leukocytes ($P<0.01$, Fig. 3). A strong correlation between concentration of lysed leukocytes and migration was observed ($R^2=0.96$). When 10×10^6 lysed leukocytes were used, the leukocyte migration was similar ($P=0.42$) to that of rhIL-8, and greater than those of 2.0×10^6 ($P<0.01$) and of 0.4×10^6 ($P<0.01$) lysed leukocytes. It was also observed that the concentration of 2×10^6 lysed leukocytes caused a greater migration ($P=0.04$) of cells than the concentration of 0.4×10^6 leukocytes.

Figure 4

Percentage of live cells was greater with leukocyte re-suspension using PBS than using saline ($P=0.01$, Fig. 4). In addition, percentage ($P<0.01$) of live leukocytes increased with increasing dilution rates. Incubation period did not affect the number of live leukocytes ($P=0.79$, Fig. 4A and 4B). No interaction was found between the period of incubation and medium ($P=0.37$). However, there was an interaction between period of incubation and dilution rate ($P<0.01$), and between medium used and dilution rate ($P=0.03$).

Figure 5

Production of reactive oxygen species was not affected by post thawing extenders ($P=0.91$), but it was by the dilution rate ($P<0.01$, Fig. 5). There was no

interaction between extenders and leukocyte concentration ($P>0.05$). A high correlation between leukocyte dilution and formation of ROS was found for leukocytes diluted in both saline ($R^2=0.86$) and PBS ($R^2=0.88$).

Discussion

In Experiment 1, the percentage of migrating leukocytes (51%) using only rhIL-8 as chemoattractant was lower than the observed by Zerbe *et al.* (2003a) (75%) and the observed in Experiment 3 (72%). In both studies, the same model of chemotactic chamber and the same rhIL-8 concentrations were used. The concentration of 25ng/mL is considered to have the best chemotactic effect for equine leukocytes (Zerbe *et al.*, 2003b). However, in the study of Zerbe *et al.* (2003a) and in Experiment 3, a volume of 300 μ L rhIL-8 was used, totalizing 7.5 μ g per well, while in Experiment 1, 100 μ L rhIL-8 per well were used, totalizing 2.5 μ g per well. The lower migration observed in Experiment 1 could be related to the lower amount of rhIL-8 used as chemoattractant and, in this way, RHIL-8 concentration should not be the only variable to be considered in the evaluation of chemotaxis.

To separate leukocytes from whole blood, Zerbe *et al.* (2003a) proceeded to lysis and washing and then to migration through a 55%-78% Percoll gradient. After centrifugation at 100 x g and 20°C for 25 minutes, neutrophils were washed twice with PBS (220 x g, 4°C, for 8 minutes) and cells were resuspended only in R3F. Using this method only live neutrophils (95% vitality) were obtained. In the present study, the separation method used provided a mixed leukocyte population with 95% vitality. In spite of the different separation techniques used in both experiments,

vitality rate was similar, and, probably, not responsible for the lower migration rate observed in the present experiment.

In Zerbe *et al.* (2003a) cells were counted using a fluorescence microscope; in the present study cells were counted by flow cytometry. This could also explain the higher percentage of leukocyte migration (29%) without rhIL-8 and dextrose, when compared to the 8% observed in Zerbe *et al.* (2003a).

Dextrose used to separate homologous plasma containing fresh leukocytes could exert a chemotactic effect, being responsible for the shorter time to eliminate bacteria (Castilho, 1994; Mattos *et al.*, 1999a). According to the studies of Mattos *et al.* (1997; 1999b), the use of dextrose for leukocyte separation could also explain the greater pregnancy rates in barren mares infused with plasma containing fresh leukocytes after breeding. In that case, 6% dextrose was used in leukocyte separation, resulting in about 2% dextrose in the supernatant (results not shown). In the present study, dextrose concentrations of 0%, 1%, 2% and 6% were used, with or without rhIL-8 (Zerbe *et al.*, 1996; Zerbe *et al.*, 2003a; b). Increasing dextrose concentrations did not increase equine leukocyte chemotaxis, when rhIL-8 was not added to the solution. This demonstrates the lack of chemotactic effect of dextrose. Therefore, the effect on bacterial elimination observed in previous reports (Castilho, 1994; Mattos *et al.*, 1999a, c), as well as the better pregnancy rates obtained (Mattos *et al.*, 1997; Mattos *et al.*, 1999b), can not be explained by chemotactic effect of dextrose, but probably by lower leukocyte apoptosis and enhanced phagocytic activity caused by use of dextrose as a gradient of separation. The use of a 6% dextrose solution to separate leukocytes also causes platelets to move into the plasma fraction. Zalavary *et al.* (1996) found that phagocytosis and respiratory burst triggered in neutrophils by immunoglobulin G (IgG)-opsonized yeast particles were

potentiated by platelets. Andonegui *et al.* (1997) showed that when neutrophils are cultured in the presence of platelets, the occurrence of apoptosis is reduced in comparison with a control where the incubation was performed without platelets.

A greater migration occurred when 1% dextrose with rhIL-8 was used. Migration decreased as dextrose concentration increased. However, there was a significant difference only when 6% dextrose with rhIL-8 was used compared with the other concentrations. This does not agree with the findings of Oldenborg and Sehlin (1999), who evaluated human neutrophil chemotaxis towards the peptide N-formyl-metionil-fenilalanin. The authors observed that the chemotactic effects of the peptide were regulated by glucose concentration, which induced activity of non-locomoting cells and improved neutrophil adhesion to the substrate.

In Experiment 2, plasma source (homologous vs. heterologous) did not affect chemotaxis. However, plasma concentration influenced leukocyte migration, and the interaction between the two kinds of plasma and concentration affects the leukocyte migration. These results demonstrate a chemotactic effect of 10% and 30% heterologous plasma as well as a chemotactic effect of 10%, 30% and 60% homologous plasma. Previous experiments (Castilho, 1994; Mattos *et al.*, 1997; Mattos *et al.*, 1999a; b; c) used plasma with leukocytes in a plasma final concentration of about 60%. Moreover, according to Mattos *et al.* (1997; 1999a), infusion with homologous plasma resulted in a shorter time to eliminate bacteria and in higher pregnancy rates when compared to untreated controls. That treatment, however, was less effective than homologous plasma with fresh leukocytes, which demonstrates a possible chemotactic and opsonizing effect from plasma, even without leukocytes. The present results concerning to plasma chemotaxis confirm those of Mattos *et al.* (1997; 1999a), who explained the therapeutic action of plasma

containing leukocytes due to a possible synergistic effect of both components of this treatments: first, plasma infusion provides opsonizing factors, such as complement and immunoglobulins, to the uterine lumen; second, fresh blood leukocytes improve phagocytosis.

Results obtained in Experiment 3 demonstrate that lysed leukocytes have chemotactic effect. When 2×10^6 lysed leukocytes were used, leukocyte attraction rate was similar to that of 30% homologous and heterologous plasma. Also, 10×10^6 lysed leukocytes had an effect similar to that of 25ng/mL rhIL-8.

Use of PBS as a diluent resulted in greater post-thaw leukocyte vitality than use of saline. The difference between both diluents increased proportionally to dilution rate and after 120-minute incubation. In the experiments of Castilho *et al.* (1997) and Zerbe *et al.* (2001), only PBS was used to resuspend thawed cells, in a dilution of 1:12.5. The cell separation method, the extender and the cryoprotectant used were the same as used in this study. Vitality and generation of ROS obtained by Castilho *et al.* (1997) and Zerbe *et al.* (2001) were measured after 6-hour incubation and are similar to the present data. These authors compared fresh and cryoconserved leukocytes and found that vitality of frozen-thawed leukocytes was similar to that of fresh leukocytes, but frozen-thawed leukocytes generated more ROS after thawing than fresh leukocytes. This might be due to stimulation of ROS production during freezing, cryopreservation, or thawing process, already described for cryoconserved spermatozoa (Weitze and Petzold, 1992).

Although leukocytes have shown greater vitality in PBS than in saline, vitality in saline was similar to PBS after 15-minute-incubation, dropping below 90% vitality after 2 hours of incubation. Both extenders showed similar effect on generation of reactive oxygen species after 15 minute-incubation. Therefore, saline

could be used as a post-thaw extender in a quick procedure (thaw, re-suspension and uterine infusion).

The present study showed that dextrose does not have a strong chemotactic effect on equine leukocytes. Among the plasma concentrations used, 10%, 30% and 60% homologous plasma and 10% and 30% heterologous plasma showed greater chemotactic effects. Lysed leukocytes, in the concentration of $2 \times 10^6/\text{mL}$, showed a chemotactic effect similar to that of 10 to 60% homologous plasma. In a concentration of $10 \times 10^6/\text{mL}$, lysed leukocytes were able to attract leukocytes at the same rate that rhIL-8. Cells re-suspended either in PBS or saline showed similar vitality and generation of reactive oxygen species in the post-thaw tests, when incubated for 15 minutes. These findings should contribute to develop a treatment protocol for mare's endometritis based on fresh or cryopreserved leukocytes uterine infusions.

References

- Andonegui G, Trevani AS, López DH, Raiden S, Giordano M, Geffner JR.** 1997. Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. *J Immunology*, 158:3372-3377.
- Asbury AC, Lyle SK.** 1993 Infectious causes of infertility. In Mckinnon AO, Voss JL (Eds.) *Equine Reproduction*. Philadelphia, USA: Lea & Febiger. pp. 381-391.
- Castilho LFF.** 1994. Treatments of endometritis in the mare with homologous plasmacontaining neutrophils [in Portuguese]. Porto Alegre, Brazil: Federal University of Rio Grande do Sul.MSc. Dissertation.
- Castilho LFF.** 1998. Untersuchung zur Separation, Gefrierkonservierung und Applikation von zirkulierenden polymorphkernigen neutrophilen Granuloziten zur Behandlung der Gebärmutter schleimhautentzündung beim Pferd. Hannover, Germany: Tierärztliche Hochschule Hannover. Thesis.
- Castilho LFF, Zerbe H, Rabe U, Leibold W, Klug E.** 1997. Isolierung und Gefrierkonservierung von immunokompetenten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zur Endometritisbehandlung beim Pferd. *Pferdeheilkunde*, 13:437-444.
- Hughes JP, Loy RG.** 1975. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. *Equine Vet J*, 7:155-159.
- Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW.** 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proc Am Ass Equine Pract*, 237-336.
- Mattos RC, Castilho LFF, Malschitzky E, Mattos R, Gregory RM.** 1999a. Treatment of endometritis of experimentally infected mares: I- effect of lavage,

plasma and leukocytes on uterine bacterial clearance. *Arq Fac Vet – UFRGS*, 27:49-60.

Mattos RC, Malschitzky E, Mattos R. 1997. Effects of different postbreeding treatments on fertility of Thoroughbred mares. *Pferdeheilkunde*, 13:512-515.

Mattos RC, Meirelles LS, Malschitzky E, Castilho LFF, Neves AP, Mattos ALG, Vieira MJ, Keller A, Hött AK, Gregory RM. 1999b. Oxytocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of postbreeding endometritis in the horse. *Pferdeheilkunde*, 15:584-587.

Mattos RC, Neves AP, Gregory RM, Gomes MJS, Mattos R, Meirelles LS, Lagares, MA, Keller, A, Wald VB, Vieira MJ, Hött AK. 1999c. Treatment of endometritis of experimentally infected mares: II-effect of ecbolic drugs and plasma enriched with leukocytes on uterine bacterial clearance. *Arq Fac Vet – UFRGS*, 27:61-72.

Oldenborg PA, Sehlin J. 1999. The glucose concentration modulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe)-stimulated chemokinesis in normal human neutrophils. *Bioscience Reprod*, 19:511-523.

Ricketts SW, Mackintosh ME. 1987. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *J Reprod Fertil Suppl*, 35:343-351

Troedsson MHT, Ibrahim NM, King VL, Foster DN, Crabo BG. 1997. Post-breeding endometritis: the role of seminal components. *Pferdeheilkunde*, 13:545.

Weitze CF, Petzold R. 1992. Preservation of semen. *J Reprod Sc*, 28:229-235.

Zalavary S, Grenegard M, Stendahl O, Bengtsson T. 1996. Platelets enhance FC(gamma) receptor mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purigenic modulation and actin polymerization. *J Leukoc Biol*, 60:58-68.

- Zerbe H, Castilho LFF, Engelke F, Mattos RC, Schuberth H-J, Klug E, Leibold W.** 2003a. Isolation and cryopreservation of functionally competent equine leukocytes. *J Vet Med*, 50:179-184.
- Zerbe H, Engelke F, Leibold W, Schoon H-A, Klug E.** 2001. Immunophenotypical and functional properties of equine uterine neutrophils of mares with or without uterine degenerative changes. *Pferdeheilkunde*, 17:650-652.
- Zerbe H, Schuberth H-J, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W.** 2003b. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology*, 60:209-223.
- Zerbe H, Schuhberth H-J, Hoedemaker M, Grunert E, Leibold W.** 1996. A new model system for endometritis: basic concept and characterization of phenotypic and functional properties of bovine uterine neutrophils. *Theriogenology*, 46:1339-1356.

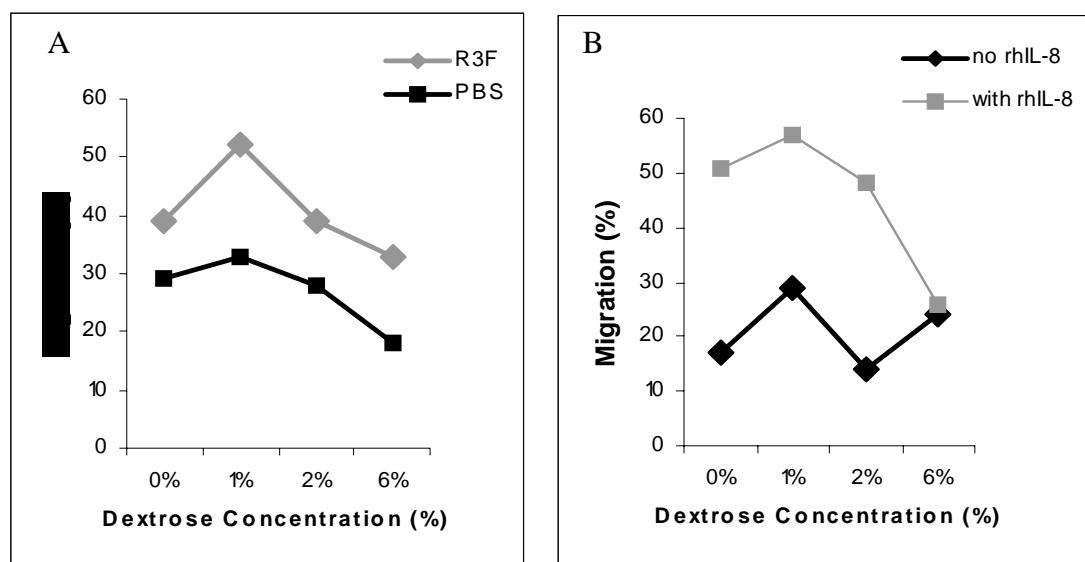


Figure 1. (A) Percent of leukocytes, diluted in PBS or R3F cell culture medium, migrating towards different dextrose concentrations ($P<0.01$).
(B) Percent of leukocytes, with or without rhIL-8, migrating towards different dextrose concentrations ($P=0.02$).

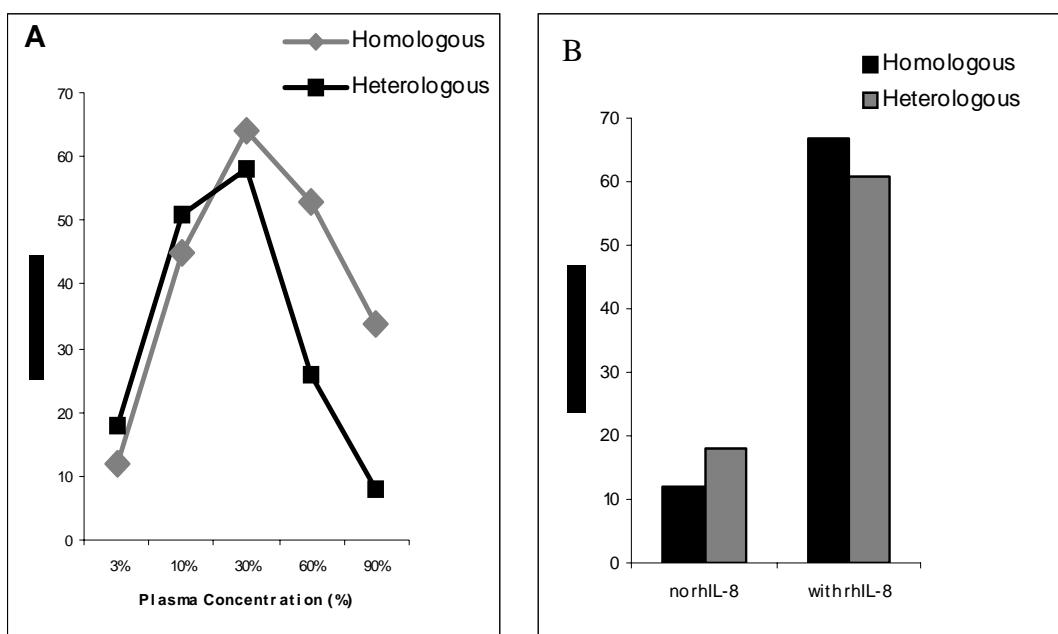
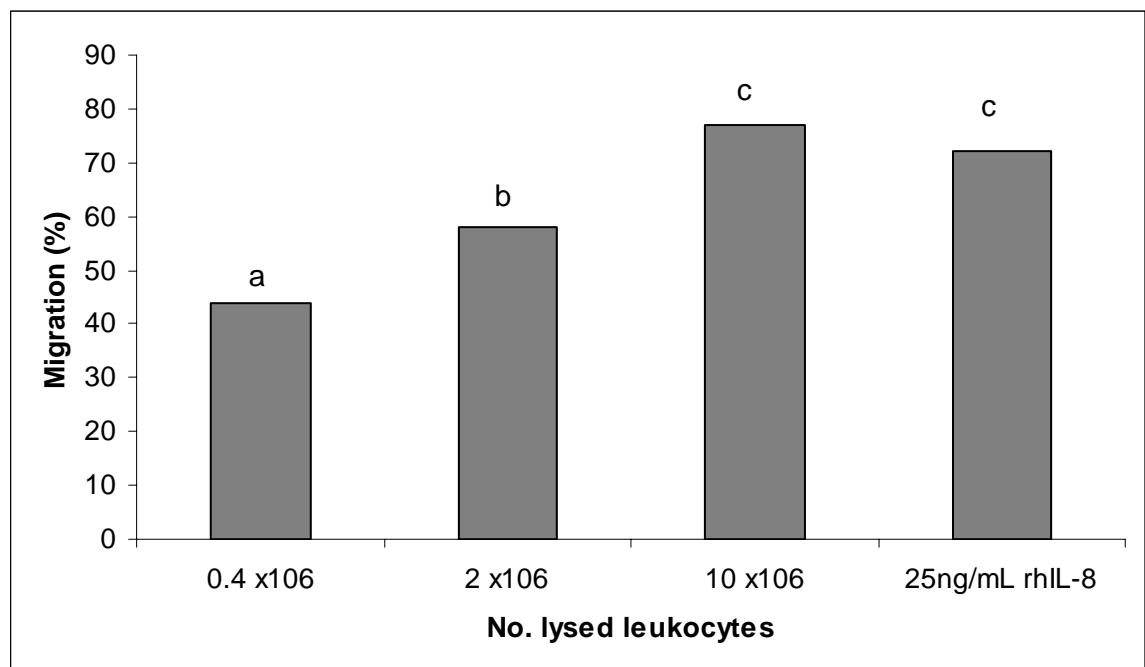


Figure 2. (A) Percent of leukocyte migration towards different concentrations (3%, 10%, 30%, 60% and 90%) of homologous and heterologous plasma ($P<0.39$). Quadratic regression analysis expressed the following equation: Migration = $134483 + (88298.8 \text{ conc.}) - (2004.04 \text{ conc}^2) + (11.7682 \text{ conc}^3)$. (B) Effect of the presence or not of rhIL-8 ($P<0.01$) with 3% homologous or heterologous plasma ($P=0.94$) on the migration of equine leukocytes.



a,b,c ($P<0.04$) different chacters indicate significant difference

Figure 3. Effect of different concentrations of lysed leukocytes and of 25 ng/mL rhIL-8 on the migration of equine leukocytes.

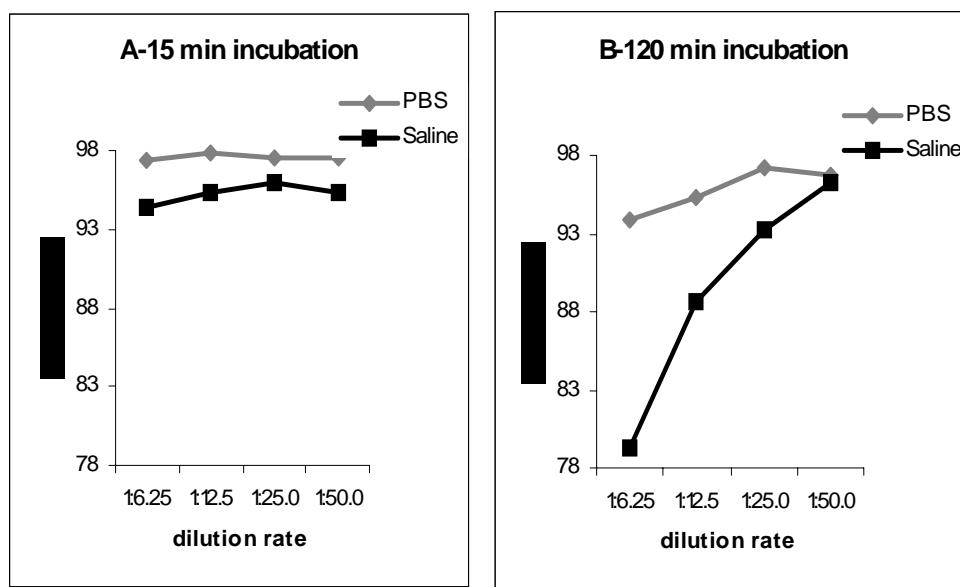


Figure 4. (A) Vitality of leukocytes thawed and re-suspended in PBS or in saline after 15-minute incubation.
(B) Vitality of leukocytes thawed and re-suspended in PBS or in saline after 120-minute incubation.
(PBS vs. saline P=0.01; dilution rate vs. vitality P<0.01; incubation period vs. vitality P=0.79).

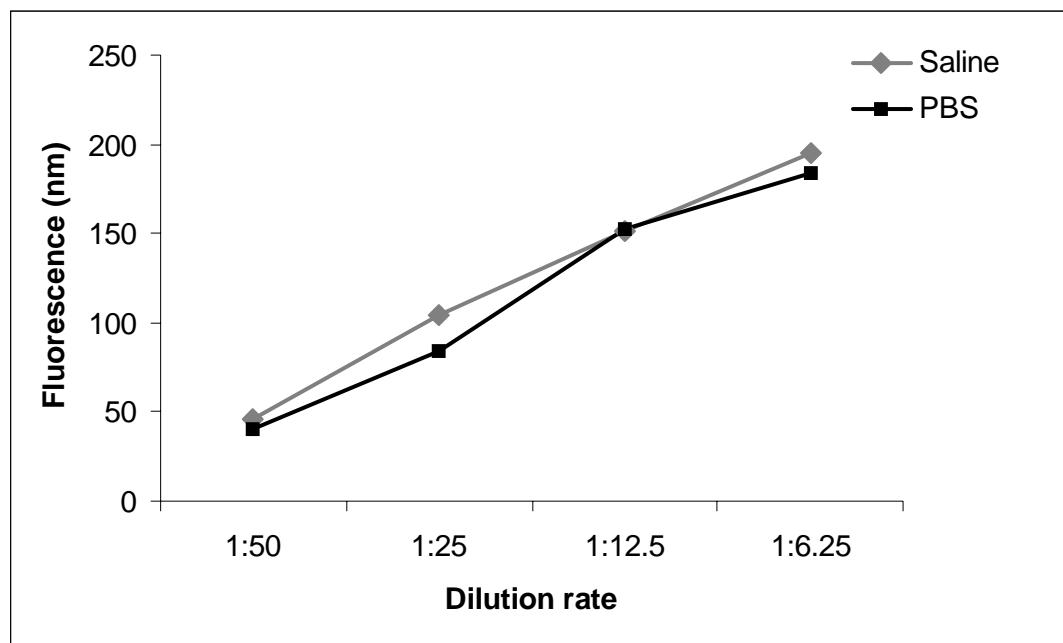


Figure 5. Generation of reactive oxygen species by thawed leukocytes stimulated with 300nMol PMA and incubated for 15 minutes in saline or PBS with different dilution rates. (PBS vs. saline $P=0.92$; dilution rate vs. fluorescence $P<0.01$).

CONCLUSÕES

Conclui-se que:

-A dextrose não apresenta bom efeito quimioatraente para leucócitos eqüinos.

-As concentrações de plasma homólogo entre 10% e 60% têm bom efeito quimiotático. Já o plasma heterólogo mostrou boa atração de leucócitos nas concentrações de 10% e de 30%.

-Na concentração de $10 \times 10^6/\text{mL}$, os leucócitos lisados atraíram leucócitos em proporção semelhante à da IL-8.

-As células diluídas em PBS ou NaCl apresentam vitalidade e geração de radicais livres de oxigênio semelhantes, quando incubados por até 15 minutos.

-Os fatores quimioatraentes não foram eficazes, porém, o efeito bactericida foi eficaz e responsável pela eliminação da bactéria.

-A infusão de plasma sanguíneo como diluente dos leucócitos congelados e dos leucócitos lisados poderia melhorar os resultados de eliminação bacteriana.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.P.; GINTHER, O.J. Efficacy of intrauterine infusion of plasma for treatment of infertility and endometritis in mares. **Journal of the American Veterinary Medicine Association** v.194(3), p.372-378, 1989.
- ALLEN, W.E. Investigations into the use of exogenous oxytocin for promoting uterine drainage in mares susceptible to endometritis. **Veterinary Record** v.128(25), p.593-594, 1991.
- ALLEN, W.E.; NEWCOMBE, J.R. Aspects of genital infection and swabbing techniques in the mare. **Veterinary Record** v.104(11), p.228-231, 1979.
- ALLEN, W.E.; PYCOCK, J.F. Current views on the pathogenesis of bacterial endometritis in mares. **The Veterinary Record** v.125(9), p.298-301, 1989.
- ALLEN, W.R.; TIPLADY, C.A.; BUTLER, S.; MACKLEY, M.R. Rheological characterization of estrous uterine fluid in the mare. **Theriogenology** v.58, p.503-506, 2002.
- ANDONEGUI, G.; TREVANI, A.S.; LÓPEZ, D.H.; RAIDEN, S.; GIORDANO, M.; GEFFNER, J.R. Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. **The Journal of Immunology** v.158, p.3372-3377, 1997.
- ASBURY, A.C. Uterine defense mechanisms in the mare: the use of plasma in the management of endometritis. **Theriogenology** v.21(2), p.387-393, 1984.
- ASBURY, A.C. Failure of uterine defense mechanisms. **Current Therapy in Equine Medicine 2.** Philadelphia, W.B. Saunders, 1987.

ASBURY, A.C. Large volume uterine lavage in the management of endometritis and acute metritis in the mare. **Compendium of Continuing Education for the Practitioner Veterinarian** v.12(10), p.1477-1479, 1990.

ASBURY, A.C.; HALLIWELL, R.E.W.; FORSTER, G.W.; LONGINO, S.J. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. **Theriogenology** v.4, p.299-308, 1980.

ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. Infectious causes of infertility. In: McKinnon, A. O.; Voss,J.L. **Equine Reproduction** Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p.381-391.

BADER, H.; KREMER, H.; VOGT, C.; SCHOON, H.A.; BEIER-HELLWIG, K. Investigations on the protein patterns of the equine uterine secretions as functional parameter of the endometrium. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.544, 1997.

BAKER, C.B.; LITTLE, T.V.; McDOWELL, K.J. Normal reproductive success rates in Thoroughbreds. **Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology** p.71-78, 1992.

BALL, B.A.; SHIN, S.J.; PATTON, V.H.; LEIN, D.H.; WOODS, G.L. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. **Theriogenology** v.29(6), p.1269-1283, 1988.

BARROS, C.M.Q. Avaliação da capacidade funcional dos neutrófilos pela técnica de quimiotaquia em éguas susceptíveis e resistentes às endometrites. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP- Júlio de Mesquita, Campus de Botucatu, Botucatu, SP, 1997, 117p.

BETSCH, J.M. Diagnostic de l'infertilité d'origine cervico-utérine chez la jument. **Recueil de Médecine Vétérinaire: Spécial Reproduction des Equidés.** v.168(11/12), p.1011-1027, 1992.

BLACK, W.G.; SIMON, J.; McNUTT, S.H.; CASIDA, L.E. Investigations on the physiologycal basis for the differential response of oestrus and pseudopregnant rabbit uteri to induced infection. **American Journal of Veterinary Research** v.14, p.318-323, 1953.

BLAICH, U.; PETZOLD, S.; BARTMANN, C.P.; LORBER, K.; SCHOON, H.-A.; RAILA, G.; BOLLWEIN, H. Doppler ultrasonographic studies of the uterine blood flow in mares. **Pferdeheilkunde** v.15(6), p.547-550, 1999.

BLUE, M.G.; BRADY, A.A.; DAVIDSON, J.N.; KENNEY, R.M. Studies on the composition and antibacterial activity of uterine fluid from mares. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.32, p.143-149, 1982.

BOLLWEIN, H.; STEFFEN, S.; STOLLA,R, The influence of drugs in uterine and ovarian blood flow in cyclic mares. **Pferdeheilkunde** v.17, p.694, 2001.

BOLLWEIN, H.; STOLLA,R.; ROHR,S.; WELTER,H.; WEBER, F.; EINSPANIER,R. Relationships between uterine blood flow, estrogens and nitric oxide in cycling mares. **Theriogenology** v.58, p.575-578, 2002.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, S.A. The effect of postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. **Theriogenology** v.33(2), p.465-475, 1990.

CADARIO, M.E.;THATCHER, W.W.; ARCHBALD, L.; THATCHER, M.J.; LEBLANC, M.M. Relationship between plasma 15 Keto-13, 14-Dihydro PGF_{2α} (PGFM) and uterine clearance of a radiocolloid following oxytocin

administration. **Havemeyer Foundation International Workshop. Uterine defense mechanisms in the mare: aspects of physical clearance.**, 1997.

CAMPBELL, M.L.H.; ENGLAND, G.C.W. A comparison of the ecbolic efficacy of intravenous and intrauterine oxytocin treatments. **Theriogenology** v.58, p.473-478, 2002.

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

CASTILHO, L.F.F. Endometrites na égua: plasma autólogo acrescido de leucócitos como forma de tratamento. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, 1994. 92p.

CASTILHO, L.F.F.; MATTOS, R.; MALSCHITZKY, E.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Lavagem uterina com solução salina como forma de tratamento da endometrite. **Arquivos da Faculdade de Veterinária – UFRGS** v.23, p.43-52, 1995.

CASTILHO, L.F.F.; ZERBE, H.; RABE, U.; LEIBOLD, W.; KLUG, E. Isolierung und Gefrierkonservierung von immunokompetenten polymorphkernigen neutrophilen Granuloziten zur Endometritisbehandlung beim Pferd. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5),p.437-444, 1997.

CASTILHO, L.F.F. Untersuchung zur Separation, Gefrierkonservierung und Applikation von zirkulierenden polymorphkernigen neutrophilen Granuloziten zur Behandlung der Gebärmutterhautentzündung beim Pferd. **Dissertation** Klinik für Pferde, 1998. 109p.

CAUSEY, R.C.; GINN, P.S.; LEBLANC, M.M. Mucus production of the equine endometrium: effect of cycle stage and susceptibility to equine endometritis. I.

Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.543, 1997.

CHEUNG, A.T.W.; LIU, I.K.M.; WALSH, E.M.; MILLER, M.E. Phagocytic and killing capacities of uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis. **American Journal of Veterinary Research** v.46(9), p.1938-1940, 1985.

COLLINS, S.M. A study of the incidence of cervical and uterine infections in Thoroughbred mares in Ireland. **Veterinary Record** v.76, p.673-675, 1964.

COMBS, G.B.; LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; TRAN, T.Q. Effects of Prostaglandin F_{2α}, Cloprostenol and Fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Theriogenology** v.45(8), p.1449-1455, 1996.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology** v.49, p.711-745, 1995.

COUTO, M.A.; HUGHES, J.P. Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.4, p.265-273, 1985.

CURNOW, E.M. Ultrasonography of the mare's uterus. **Equine Veterinary Education** v.3(4), p.190-193, 1991

DAVIS, L.E; ABBIT, B. Clinical pharmacology of antibacterial drugs in the uterus of the mare. **Journal of the American Veterinary Medicine Association** v.170(2), p.204-207, 1977.

DE LILLE, A.J. A.E.; SILVERS, M.L.; CADARIO, M.E.; TRAN, T.Q.; CAGE, C.L.; LEBLANC, M.M. Interaction of xylazine, acepromazine and oxytocin on

intrauterine pressure in normal mares and those exhibiting a delay in uterine clearance. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.56, p.373-379, 2000.

DESKUR-SMIELECKA, E.; WYKRETOWICZ, A.; BANASZAK, A.; SZCZEPANIK, A.; FURMANIUK, J.; WYSOCKI, H. The influence of treatment of hypercholesterolemic patients with simvastatin on plasma chemotactic activity and adherence of neutrophils. **International Journal of Cardiology** v.75, p.85-90, 2000.

EASLEY, J. External perineal conformation. In: McKinnon, A.O.; Voss, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p. 20-24.

EILTS, B.E.; MCCOY, D.J.; TAYLOR, H.W.; AL-BAGDADI, F.K.; HANSEN, P.N.; MOSER, E.B. Effect of repeated intrauterine infusions of gentamicin on the equine endometrium. **Theriogenology** v.29(6), p.1253-1260, 1988.

ENGELKE, F.; ZERBE, H.; KLUG, E.; LEIBOLD, W. A new model system for endometritis in mares – preliminary results. **Pferdeheilkunde** v.15, p.579-583, 1999.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection** v.5(14), p.1317-1327, 2003.

FARRELY, B.T.; MULLANEY, M.A. Cervical and uterine infection in Thoroughbred mares. **Irish Veterinary Journal** v.18, p.201-212, 1964.

FERREIRA-DIAS, G.; NEQUIN, L.G.; KING, S.S. Morphologic characteristics of equine endometrium classified as kenney categories I, II and III, using light and scanning electron microscopy. **American Journal of Veterinary Research** v.55(8), p.1060-1065, 1994.

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

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A.; STEIGER, K.; MATTOS, A.L.G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Effect of skim milk and seminal plasma uterine infusions in mares. **Theriogenology** v.58(2), p.491-494, 2002.

FREEMAN, K.P.; ROSZEL, J.F.; SLUSHER, S.H. Equine endometrial cytologic smear patterns. **Compendium of Continuing Education for the Practitioner Veterinarian** v.8, p.349, 1986.

GODDARD, P.J.; ALLEN, W.R. Genital tract pressures in mares II- Changes induced by oxytocin and PGF_{2α}. **Theriogenology** v.24, p.35-44, 1984.

GÖTZE, R. **Besamung und Unfruchtbarkeit der Hausaugtiere**. Verlag Shapen, 1949.

GRIMSTAD, I.A.; BENESTAD, H.B. A new assay for leukocyte chemotaxis using cell retrieval, electronic particle counting and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods** 49(2), p.215-233, 1982.

GYGAX, A.P.; GANJAM, V.K.; KENNEY, R.M. Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.27, p.571-578, 1978.

HINRICHES, K.; SPENSLEY, M.S.; McDONOUGH, P.L. Evaluation of progesterone treatment to create a model for equine endometritis. **Equine Veterinary Journal** v.23(6), p.457-461, 1992.

HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. **Progress in Drugs Research** 37: 91-105, 1991.

HUGHES, J.P. Reproductive panel discussion. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. St. Louis, 1978, p. 188-201.

HUGHES, J.P.; LOY, R.G. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. **Equine Veterinary Journal** v.7, p.155-159, 1975.

IRVINE, C.H.G. Prostaglandins. In: MCKINNON, A.O; VOSS, J.L. **Equine Reproduction** 1.Ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993.

JOHNSON, J.U.; OXENDER, W.D.; BERKHOFF, H.A. Influence of estrogen on antibacterial and immunoglobulin secretory activities of uterine fluids from ovariectomized mares. **American Journal of Veterinary Research** v.55(5), p.643-649, 1994.

JONES, D. Fluid distribution and cervical loss following intrauterine infusion in the mare. **Equine Practice**, v.17(1), p.12-19, 1995.

KATILA, T. Interactions of the uterus and semen. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.508-511, 1997.

KATILA, T. Uterine contractility in nonpregnant mares. **Pferdeheilkunde** 15(6), p.574-578, 1999.

KELLER, A.; NEVES, A.P; SCHOON, H.A.; AUPPERLE, H.; MATTOS, R.C. Efeito de infecções bacterianas sucessivas sobre o grau de endometrose da égua. **Trabalho submetido para publicação**. 2004

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

KENNEY, R.M. The etiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis (CDE). J. P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal**. v.25(3), p.185-186, 1993.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: technics and preliminary findings. In: Annual Conv. of Am. Ass. of Equine Practicioners, 21, 1975. **Proceedings. American Association of Equine Practitioners 1975**. p.237-336.

KENNEY, R.M.; KHALEEL, S.A. Bacteriostatic activity of the mare uterus: a progress report on immunology. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.23, p.357-358, 1975.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology 2** p.723-736, Philadelphia, WB Saunders, 1986.

KHARDORI, N.; YASSIEN, M. Biofilms in device-related infections. **Journal of Industrial Microbiology** v.15, p.141-147, 1995.

KING, S.S.; CARNEVALE, E.M.; NEQUIN, L.G.; CRAWFORD, J.J. Inhibition of bacterial endometritis with mannose. **Journal of Equine Veterinary Science** v.18(5), p.332-334, 1998

KNUDSEN, O. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. **Cornell Veterinarian** v.54, p.415-422, 1964.

KNUTTI, B.; PYCOCK, J.F.; PACCAMONTI, D.; JONKER, H.; VAN DER WEIJDEN, G.C. The influence of early postbreeding uterine lavage on uterine fluid accumulation in the mare highly susceptible to acute endometritis. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.545, 1997.

KOTILAINEN, T., HUHTINEN, M., KATILA, T. Sperm-induced leucocytosis in the equine uterus. **Theriogenology** v.41, p.629–636, 1994.

KWON, M.S. Vergleichende Untersuchungen von eingeschafften neutrophiler Granulozyten. **Dissertation** - Klinik für Pferde, 1987.

LANGONI, H.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; SAKAMOTO, C.; SIMON, J.J.; LISTONI, F.J.P.; CARREIRA, E.L.C. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.46(6), p.623-636, 1994.

LEBLANC,M.M.; ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **American Journal of Veterinary Research** v.50(6), p.864-867, 1989a.

LEBLANC,M.M.; ASBURY, A.C.; RATHWELL, A.C.; PACCAMONTI, D.L. The effect of intrauterine infusion of ticarcillin disodium one hour post-coitus in reproductively normal mares. **Equine Practice** v.11(10), p.33-38, 1989b.

LEBLANC, M.M.; WARD, L.; TRAN, T.; WIDDER, P. Identification and opsonic activity of immunoglobulins recognizing *Streptococcus zooepidemicus* antigens in uterine fluids of mares. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.44, p.289-296, 1991.

LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, A.C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal

mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Veterinary Journal** v.26(2), p.109-113, 1994a.

LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E.; TRAN, T. Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Equine Veterinary Journal** v.26(4), p.279-282, 1994b.

LEBLANC, M.M. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.483-485, 1997.

LEY, W.B. Current thoughts on the diagnosis and treatment of acute endometritis in mares. **Veterinary Medicine** v.89(7), p.648-660, 1994.

LIU, I.K.M.; CHEUNG, A.T.W. Immunoglobulin and neutrophil defense against uterine infection in mares resistant and susceptible to chronic endometritis: a review. **Journal of the American Veterinary Medicine Association** v.189(6), p.700-702, 1986.

LIU, I.K.M.; CHEUNG, A.T.W.; WALSH, E.M.; MILLER, M.E.; LINDBERG, P.M. Comparison of peripheral blood and uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to endometritis: chemotactic and cell elastometry analysis. **American Journal of Veterinary Research** v.46(4), p.917-920, 1985.

LIU, I.K.M.; TROEDSSON, M.H.T.; MORAES, M.D. Correlations of endometrial biopsy with clinical response to intra-uterine bacterial inoculation. J. P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal** v.25(3), p.188, 1993.

LUDWIG, S.; BLAICH, U.; SCHOON, D.; AUPPERLE, H.; SCHOON, H.A.; BARTMANN, C.P.; KLUG, E. Functional pathology of the uterine blood flow in the mare—pathohistologic and Doppler sonographic investigations. **Theriogenology** v.58(2), p.511-513, 2002.

MACFAUL, S.J.; BOWMAN, P.; VILLA, V.M. Hemoglobin stimulates the release of proinflammatory cytokines from leukocytes in whole blood. **Journal of Laboratory Clinical Medicine** v.135(3), p.263-269, 2000.

MADILL, S.; TROEDSSON, M.H.T.; SANTSCHI, E.M.; MALONE, E.D. Dose-response effect of intramuscular oxytocin treatment on myometrial contraction of reproductively normal mares during estrus. **Theriogenology** v.58, p.479-482, 2002.

MALSCHITZKY, E. Efeito de diferentes tratamentos pós-cobertura na fertilidade de éguas Puro-Sangue de Corrida. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, 1998. 90p.

MAGISTRINI, M.; SEGUIN, F.; BEAU, P.; AKOKA, S.; LE PAPE, A.; PALMER, E. H-Nuclear magnetic resonance analysis of stallion genital tract fluids and seminal plasma: contribution of the accessory glands to the ejaculate. **Biology of Reproduction: Monograph Series: Equine Reproduction VI** v.1, p.599-607, 1995.

MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.23, p.47-52, 1975.

MATTOS, R.C. Manejo Reprodutivo da Égua. In: Taranto, J.R. **Sangue e Raça**. Rio de Janeiro, RJ. Ed. Index Ltda., 1989. p. 69-81.

MATTOS, R.C.; MATTOS, A.L.G.; GUNZEL, A.R.; KLUG, E. Citologia endometrial na égua como método de diagnóstico auxiliar e complementar. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.8(2), p.83-90, 1984.

MATTOS, R.C.; ROCHA, A.L.A.; ZIMMER Jr., O.; MATTOS, R.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M. Use of methylergonovine maleate and cloprostenol during uterine involution to improve conception rates of the foal heat. **Biology of Reproduction: Monograph Series: Equine Reproduction VI.** v.1, p.533-538, 1995.

MATTOS, R.C.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS, R.; GREGORY, R.M. Effects of different postbreeding treatments on fertility of Thoroughbred mares. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde.** v.13(5), p.512-515, 1997.

MATTOS, R.C.; CASTILHO, L.F.F.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS, R.; GREGORY, R.M. Treatment of endometritis of experimentally infected mares: I-effect of lavage, plasma and leukocytes on uterine bacterial clearance. **Arquivos da Faculdade de Veterinária – UFRGS** 27(1), p.49-60, 1999a.

MATTOS, R.C.; MEIRELLES, L.S.; MALSCHITZKY, E.; CASTILHO, L.F.F.; NEVES, A.P.; MATTOS, A.L.G.; VIEIRA, M.J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; GREGORY, R.M. Oxytocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of postbreeding endometritis in the horse. **Pferdeheilkunde** 15(6), p.584-587, 1999b.

MATTOS, R.C.; NEVES, A.P.; GREGORY, R.M.; GOMES, M.J.S.; MATTOS, R.; MEIRELLES, L.S.; LAGARES, M.A.; KELLER, A.; WALD, V.B.; VIEIRA, M.J.; HÖTT, A.K. Treatment of endometritis of experimentally infected mares: II-effect of ecbolic drugs and plasma enriched with leukocytes on uterine bacterial clearance. **Arquivos da Faculdade de Veterinária – UFRGS** v.27(1), p.61-72, 1999c.

MERKT, H.; VON LEPPEL, J.F. Die Entnahme von Proben für die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie

Behandlungshinweise. **Deutsch Tierärztliche Wochenschrift** v.77(19), p.489-528, 1970.

MERKT, H.; JACOBS, O.; KLUG, E.; AUKES, E. An analysis of stallion fertility RATES (foals born alive) from the breeding documents of the Landgestüt Celle over a 158- year period. **Journal of Reproduction and Fertility,.Supplement** v.27, p.73-77, 1979.

MITCHELL, G.; LIU, I.K.M.; PERRYMAN, L.E.; STABENFELDT, G.H.; HUGHES, J. P. Preferencial production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium- a mucosal immune system. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.32, p.161-168, 1982.

MORRESEY, P.R. Ciliated v. non-ciliated cells in the equine endometrium during estrus as determined by image analysis: preliminary data. **Havemeyer Foundation International Workshop: Uterine Defense Mechanisms in the Mare: Aspects of Physical Clearance.** 1997.

NEVES, A.P. Endometrite na égua: combinação do uso de mecanismos físicos e de mecanismos celulares como forma de tratamento. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, 1998. 93p.

NEVES, A.P; ENGELKE, F.; ZERBE, H.; GREGORY, R.M.; LEIBOLD, W.; KLUG, E.; MATTOS, R.C. Avaliação da Migração por Quimiotaxia, da Vitalidade e da Produção de Radicais Livres de Oxigênio de Leucócitos Eqüinos Frescos, Congelados e Lisados **Trabalho submetido para publicação.** 2004

NIE, G.J.; JOHNSON, K.E.; WENZEL, J.G.W.; BRADEN, T.D. Effect of periovulatory ecbolics on luteal function and fertility. **Theriogenology** v.58(2), p.461-463, 2002.

NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H.; WATSON, E.D. Oxytocin and PGF-2 alpha release in mares resistant and susceptible to persistant mating induced endometritis. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.56, p.363-372, 2000.

OLDENBORG, P.A.; SEHLIN, J. The glucose concentration modulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe)-stimulated chemokinesis in normal human neutrophils. **Bioscience Reproduction** v.19(6), p.511-523, 1999.

PASCOE, D.R. Observations on the lenght and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**. v.27, p.299-305, 1979.

PASCOE, D.R. Incidence and significance of pneumovagina, foal heat mating and other management factors on the occurrence of uterine susceptibility. J. P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal** v.25(3), p.187, 1993.

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

PEGG, P.J. The preservation of leukocytes for cytogenic and cytochemical studies. **British Journal of Haematology** v.11, p.586-591, 1965.

PERSSON, K.;LARSSON,I.;HALLEN SANDGREN, C. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology** p.37, v.99-112, 1993.

PIMENTEL, C.A.; SANTOS, P.F.M.; ALVES, A.M.; HAMMES, A.M. Biópsia endometrial em equinos. In: Laboratório Regional de Diagnósticos. **Doenças diagnosticadas no ano de 1989**. Pelotas, UFPEL, 1989. p. 47-49.

POTTER, N.S.; HARDING, C.V. Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. **The Journal of Immunology** v.167, p.2538-2546, 2001.

POURET, E.J.M. Surgical technique for the correction of pneumo- and urovagina. **Equine Veterinary Journal** v.14(3), p.249-250, 1982.

PYCOCK, J.F.; ALLEN, W.E. Equine neutrophil locomotion in response to Streptococcus zooepidemicus. **Equine Veterinary Journal** v.20(6), p.448-450, 1988.

PYCOCK, J.F.; ALLEN, W.E. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. **Equine Veterinary Journal** 22(6), p.422-425, 1990.

PYCOCK, J. F.; NEWCOMBE, J. R. Assessment of the effect of three treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. **Veterinary Record** v.138(6), p.320-323, 1996.

PYCOCK, J.F.; PACCAMONTI, D.; JONKER, H.; NEWCOMBE, J.; VAN DER WEIJDEN, G.; TAVERNE, M. Can mares be classified as resistant or susceptible to recurrent endometritis? I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.431-436, 1997.

RALL, T.W.; SCHLEIFER, L.S. Ocitocina, prostaglandinas, alcalóides do esporão do centeio e outras drogas. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 7.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1987.

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

REISWIG, J. D.; THRELFALL, W. R.; ROSOL, T. J. A comparison of endometrial biopsy, culture and cytology during oestrus and dioestrus in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 25(3): p. 240-241, 1993.

RICKETTS, S.W.; WINGFIELD-DIGBY, N.J. Endometrial cytology. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.32, p.638-639, 1982.

RICKETTS, S.W.; MACINTOSH, M.E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.35, p.343-351, 1987.

ROITT, I.M.; BRUSTOFF, J.; MALE, D.K. **Células envolvidas na resposta imune**. In: Imunologia –2.ed. São Paulo, Manole, 1992, p. 2.1-2.18.

ROSSDALE, P.D.; RICKETTS, S.W. **Equine Stud Farm Medicine**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1980. p.52-53.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Vascular lesions in the equine endometrium. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.546, 1997.

SCHOON, D.; SCHOON, H.-A.; KLUG, E. Angioses in the equine endometrium – pathogenesis and clinical correlations. **Pferdeheilkunde** v.15(6), p.541-546, 1999.

SCOTT, M. Comparison of various intrauterine treatments for uterine infections in susceptible mares. **Equine Veterinary Journal** v.25(3), p.193, 1993.

SIEME,H.; SCHRÖTER, N.; KLUG, E.; SCHOON, H.-A. Influence of prostaglandin F_{2α} on conception rate of mares inseminated with chilled semen. **Pferdeheilkunde** 13(5), p.558, 1997.

SILVA, C.A.M. Uma nova técnica para correção cirúrgica de pneumovagina na égua. **Turf e Fomento** v.23(4), p.247-248, 1983.

SILVA, C.A.M. Infecções uterinas na égua. In: **Congresso Brasileiro De Reprodução Animal**, 8., 1989. Belo Horizonte, MG.

SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. **Anatomia dos Animais Domésticos**. v.1. Ed. Interamericana. Rio de Janeiro, RJ, p.512-513, 1975.

SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; SHIDELER, R.K. Influence of bacterial challenge and long-term progesterone on endometritis of mares. **Equine Veterinary Science** v.12(2), p.24-26, 1992.

STRZEMIENSKI, P.J.; KENNEY, R.M. Antibacterial activity of mare uterine fluid. **Biology of Reproduction** v.31, p.303-311, 1984.

TEPPERMAN, H.M.; BEYDOUN, S.N.; ABDUL-KARIN, R.W. Drugs affecting myometrial contractility in pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology** v.20(2), p.423-445, 1977.

THRELLFALL, W.R.; CARLETON, C.L. Treatment of uterine infection in the mare. In: **Current Therapy in Theriogenology** 2.ed. D.^a Morrow, W. B. Saunders. Philadelphia, 1986. p.730-737.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BERLOUGH, J.E. The genus *Streptococcus*. **Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**. Ch. 19, 181-187. Constock Publishing Assoc., Ithaca, NY. 8.ed., 1986.

TIPLADY, C.A.; BUTLER, S.; ALLEN, W.R.; MACKLEY, M.R. Rheological characterization of equine uterine fluid. **Pferdeheilkunde** v.17(6), p.681, 2001.

TISCHNER, M.; KOSINIAK, K.; BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility** v.41, p.329-335, 1975.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M. Uterine clearance of non-antigenic markers (⁵¹Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.44, p.283-288, 1991.

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

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; 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 infection. **Biology of Reproduction** v.49, p.502-506, 1993a.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; THURMOND, M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. **Biology of Reproduction** v.49,p.507-514, 1993b.

TROEDSSON, M.H.T.; WISTRÖM, A.O.G.; LIU, I.K.M.; ING, M.; PASCOE,J.; THURMOND,M. Registration of myometrial activity using multiple site electromyography in cyclic mares. **Journal of Reproduction and Fertility** v.99: p.299-306, 1993c.

TROEDSSON, M.H.T.; SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. **American Journal of Veterinary Research** v.56(4), p.468-472, 1995.

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

TROEDSSON, M.H.T.; IBRAHIM, N.M.; KING, V.L.; FOSTER, D.N. CRABO, B.G. Post-breeding endometritis: the role of seminal components. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.545, 1997.

TROEDSSON, M.H.T.; LEE,C.S.; FRANKLIN,R.; CRABO, B.G. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.56, p.341-349, 2000.

TROEDSSON, M.H.T.; FRANKLIN,R.; CRABO, B.G. Suppression of PMN-chemotaxis by different molecular weight fractions of equine seminal plasma. **Pferdeheikunde** v.15(6), p.568-573, 1999.

TROEDSSON, M.H.T.; ALGHAMDI, A.S.; MATTISEN, J. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology** v.58(2), p.453-456, 2002.

TRUAX, R.E.; POWELL, M.D.; MONTELARO, R.C.; ISSEL, C.J.; NEWMAN, M.J. Cryopreservation of equine mononuclear cells for immunological studies. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v.25, p.139-153, 1990.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. An update on uterine defense mechanisms in the mare. **Equine Veterinary Science** v.10(3), p.169-174, 1990.

VIEIRA, M.J.; HÖTT, A.K.; MALSCHITZKY, E.; KELLER, A.; WALD, V.B.; MATTOS, A.L.G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Antimicrobial agents in extender and their effect on semen preservation and pregnancy rate of inseminated mares. **Theriogenology** 58, p.667-670, 2002.

VON REITZENSTEIN, M.; CALLAHAN,M.A.; HANSEN,P.J.; LEBLANC,M.M. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. **Theriogenology** v.58(5), p.887-898, 2002.

VOSS, J.L. Intrauterine infections in mares. In: Symposium on Mare Infertility, 1984, Las Vegas, Nevada. **Proceedings** Las Vegas, Western States Veterinary Conference, 1984. p.5-7.

WAELCHLI, R.O.; CORBOZ, L.; DOEBELI, M. Streptomycin-resistant *Escherichia coli* as a marker of vulvovestibular contamination of endometrial culture swabs in the mare. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56: p.308-312, 1992.

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

WATSON, E.D Effect of ovarian steroids on migration of uterine luminal neutrophils and on chemokinetic factors in uterine secretions from mares. **Equine Veterinary Journal** v.20(5), p.368-370, 1988a.

WATSON, E.D. Uterine defense mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. **Equine Veterinary Journal** v.20(6), p.397-400, 1988b.

WATSON, E.D.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v.16(2), p.107-121, 1987a.

WATSON, E.D.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. Influence of administration of ovarian steroids on the function of neutrophils isolated from the blood and uterus of ovariectomized mares. **Journal of Endocrinology** v.112(3), p.443-448, 1987b.

WATSON, E.D.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. Influence of ovarian steroids on adherence (*in vitro*) of *Streptococcus zooepidemicus* to endometrial epithelial cells. **Equine Veterinary Journal** v.20(5), p.371-372, 1988a.

WATSON, E.D.; STOKES, C.R. Plasma cell numbers in uteri of mares with persistent endometritis and in ovariectomized mares treated with ovarian steroids. **Equine Veterinary Journal** v.20(6), p.424-425, 1988b.

WATSON, E.D.; BJORKSTEN, T.S.; BUCKINGHAM, J.; NIKOLAKOPOULOS, E. Immunolocalisation of oxytocin and neurophysin in the uterus of the mare. **7th. International Symposium on Equine Reproduction.** p.75-76, 1998.

WEITZE, C.F.; PETZOLD, R. Preservation of semen. **Journal of Reproduction Science** v.28, p.229-235, 1992.

WELSH, R.D. The significance of *Streptococcus zooepidemicus* in the horse. **Equine Practice** v.6(9), p.7-16, 1984.

WIDDERS, P.R.; WARNER, S.; HUNTINGTON, P.J. Immunisation of mares to control endometritis caused by *Streptococcus zooepidemicus*. **Research in Veterinary Science** v.58, p.75-81, 1985.

WILLIAMSON, P.; MUNYUA, S.; MARTIN, R.; PENHALE, W.J. Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.35, p.317-325, 1987.

WINGFIELD-DIGBY, N.J.; RICKETTS, S.W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement** v.32, p.181-185, 1982.

WITTENBRINK, M.M.; HÖLZLE, L; BAUMEISTER, A.K. Mechanisms of bacterial pathogenesis in equine endometritis. I. Intl. Konferenz über Endometritis- Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v.13(5), p.450-452, 1997.

ZALAVARY, S.; GRENEGARD, M.; STENDAHL, O.; BENGTSSON, T. Platelets enhance FC- γ receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. **Journal of Leukocyte Biology** v.60(7), p.58-68, 1996.

ZERBE, H.; SCHUHBERTH, H.-J.; HOEDEMAKER, M.; GRUNERT, E.; LEIBOLD, W. A new model system for endometritis: basic concept and characterization of phenotypic and functional properties of bovine uterine neutrophils. **Theriogenology** v.46, p.1339-1356, 1996.

ZERBE, H.; ENGELKE, F.; LEIBOLD, W.; SCHOON, H.A.; KLUG, E. Immunophenotypical and functional properties of equine uterine neutrophils of mares with or without degenerative endometrial changes. **Pferdeheilkunde** 17(6), 650-652, 2001.

ZERBE, H.; CASTILHO, L.F.F.; ENGELKE, F.; MATTOS, R.C.; SCHUBERTH, H.-J; KLUG, E.; LEIBOLD, W. Isolation and cryopreservation of functionally

competent equine leukocytes. **Journal of Veterinary Medicine** 50, 179-184, 2003a.

ZERBE, H.; SCHUBERTH, H.-J.; ENGELKE, F.; FRANK, J.; KLUG, E.; LEIBOLD, W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. **Theriogenology**, 60: p.209-223, 2003b.

ZIMMER JR., O. Influência dos tratamentos com cloprostenol e maleato de metilergonovina no puerpério de éguas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). UFRGS. Porto Alegre, Brasil, 1994. 74p.

6 ANEXOS

ANEXO 1. TABELAS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

TABELA 7- Análise de variância da migração em relação a diferentes concentrações de dextrose

FONTE	GL	SQ	QM	F	P
ÉGUA	6	0.20469836	0.03411639	0.61	0.7252
IL8	1	4.02264163	4.02264163	71.42	0.0001
MEIO	1	1.10804166	1.10804166	19.67	0.0001
CONCENTRAÇÃO	3	0.56553976	0.18851325	3.35	0.0219
IL8*CONC.	3	0.41736995	0.13912332	2.47	0.0659

TABELA 8- Análise de variância da migração em relação a diferentes concentrações de plasma

FONTE	GL	Seq SQ	Adj SQ	Adj QM	F	P
Tipo	1	8.7768E+10	1.9850E+10	1.9850E+10	0.92	0.391
Concentm	1	3.9633E+10	6.83210E+10	6.83210E+10	31.75	0.005
Conc ²	1	7.1198E+10	4.89210E+10	4.89210E+10	22.74	0.009
Conc ³	1	3.3860E+10	3.3860E+10	3.3860E+10	15.74	0.017
Meio*conc	1	1.8743E+10	1.8743E+10	1.8743E+10	8.71	0.042
Erro	4	8.6065E+10	8.6065E+10	2.1516E+10		
Total	9	1.4515E+10				

TABELA 9- Análise de variância da migração em relação a 3% de plasma com ou sem IL8.

FONTE	GL	Seq SQ	Adj SQ	Adj QM	F	P
Tipo	1	133564249	133564249	133564249	0.01	0.940
IL8*MEIO	1	9.7494E+11	9.7494E+11	9.7494E+11	64.92	0.079
Erro	1	1.5017E+10	1.5017E+10	1.5017E+10		
Total	3	99009E+11				

TABELA 10-Análise de variância vitalidade pós-descongelamento de leucócitos eqüinos em meio PBS ou NaCl

FONTE	GL	Seq SQ	Adj SQ	Adj QM	F	P
Diluição	1	0.16872	0.16872	0.16872	38.78	0.000
Tempo	1	0.20138	0.00027	0.00027	0.06	0.810
Meio	1	0.32079	0.04059	0.04059	9.33	0.012
Tempo*Diluição	1	0.09369	0.09369	0.09369	21.54	0.000
Meio*Diluição	1	0.02646	0.02646	0.02646	6.08	0.033
Erro	10	0.04350	0.04350	0.00435		
Total	15	0.85454				

TABELA 11- Análise de variância dos dias necessários à eliminação da bactéria em éguas resistentes

FONTE	GL	Seq SQ	Adj SQ	Adj QM	F	P
Repetição	4	5.200	5.200	1.300	0.76	0.555
Égua	19	46.800	46.800	2.463	1.44	0.137
Tratamento ²	4	12.700	12.700	3.175	1.85	0.128
Erro	72	123.300	123.300	1.712		
Total	99	188.000				

TABELA 12- Análise de variância dos dias necessários à normalização do quadro citológico em éguas resistentes

FONTE	GL	Seq SQ	Adj SQ	Adj QM	F	P
Repetição	4	14.340	14.340	3.585	1.61	0.180
Égua	19	61.240	61.240	3.223	1.45	0.132
Tratamento ²	4	32.840	32.840	8.210	3.69	0.009
Erro	72	160.020	160.020	2.222		
Total	99	268.440				

TABELA 13- Análise de variância dos dias necessários à eliminação da bactéria em éguas susceptíveis

FONTE	GL	Seq SQ	Adj SQ	Adj QM	F	P
Repetição	4	15.440	15.440	3.860	2.47	0.101
Égua	4	4.240	4.240	1.060	0.68	0.619
Tratamento ²	4	49.840	49.840	12.460	7.99	0.002
Erro	12	18.720	18.720	1.560		
Total	24	88.240				

TABELA 14- Análise de variância dos dias necessários à normalização do quadro citológico em éguas susceptíveis

FONTE	GL	Seq SQ	Adj SQ	Adj QM	F	P
Repetição	4	13.840	13.840	3.460	1.37	0.302
Égua	19	6.240	6.240	1.560	0.62	0.659
Tratamento ²	4	77.440	77.440	19.360	7.66	0.003
Erro	72	30.320	30.320	2.527		
Total	99	127.840				

ANEXO 2- RESUMO PUBLICADO EM PERIÓDICO