

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

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA-FUNCIONAL DA RECUPERAÇÃO DO  
ENDOMÉTRIO EQUINO ATRAVÉS DA INFUSÃO DE NEUTRÓFILOS  
IMUNOCOMPETENTES CRIOPRESERVADOS, BASEADO EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DEFINIDO.**

**ANDREA KELLER**

**PORTO ALEGRE  
2004**

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

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA-FUNCIONAL DA RECUPERAÇÃO DO  
ENDOMETRIO EQUINO ATRAVÉS DA INFUSÃO DE NEUTRÓFILOS  
IMUNOCOMPETENTES CRIOPRESERVADOS, BASEADO EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DEFINIDO.**

**ANDREA KELLER**

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  
2004**

**K29a Keller, Andrea**

Avaliação morfológica-funcional da recuperação do endométrio equino através da infusão de neutrófilos imunocompetentes criopreservados, baseado em um modelo experimental definido./

Andréa Keller - Porto Alegre: UFRGS, 2004.

105 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2004. Rodrigo Costa Mattos, Orient.

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

**ANDREA KELLER**

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA-FUNCIONAL DA RECUPERAÇÃO DO  
ENDOMÉTRIO EQÜINO ATRAVÉS DA INFUSÃO DE NEUTRÓFILOS  
IMUNOCOMPETENTES CRIOPRESERVADOS, BASEADO EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DEFINIDO**

APROVADA POR:

---

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos, pela confiança, perseverança e imensa disposição para o trabalho.

A Profa. Dra Ana Luisa Gelpi Mattos pelo sempre valioso auxílio na correção e tradução da tese.

Ao Instituto de Patologia da Faculdade de Veterinária de Leipzig, pela oportunidade de realizar a parte experimental da tese.

Ao Prof. Dr. Schoon e à sua esposa Prof. Dr. Doris Schoon, pela orientação e acolhida.

A Dra Heike Aupperle por me receber em sua casa e pela orientação na avaliação dos exames histopatológicos. A Dra Katja Steiger, pela amizade e o acompanhamento durante os meses em que estive na Alemanha.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos e ao PROBAL/CAPES/DAAD, que possibilitaram a realização deste projeto em conjunto com as Universidades de Leipzig e Hannover.

Aos colegas do REPROLAB, Adriana Pires Neves, Sandra Fiala e Cristina Trein, pela ajuda e pela amizade.

À diretoria da FAURGS, por permitir o acampamento de doutorandos, pilhas de livros, trabalhos e chimarrão dos últimos meses.

A amiga e colega Dra. Magda Jochims Vieira, pela paciência e ajuda nestes quatro últimos meses, e por não ter permitido que o estresse abalasse nossa amizade.

Ao Médico Veterinário Amauri Anselmo, por confiar em mim e compreender que o trabalho, nestes últimos dois meses, não recebeu toda a atenção necessária por uma causa muito importante.

Ao médico Veterinário Paulo Sérgio de Mello Silva, por estar sempre pronto e disposto a ajudar e pelas substituições imprescindíveis para a realização desta tese.

Aos funcionários da Fazenda Jamaica, Fernando, Kiko, Silvano e Gerson, pela compreensão, pelas horas extras, pelo trabalho fora de hora e...ufa!, mesmo assim estarem sempre prontos a ajudar.

À Méd. Veterinária Vanessa Rizzo, pela amizade e por estar sempre pronta para me “socorrer” nos atendimentos que não pude fazer, e ao Méd. Vet. Alexandre Schilela, que se prontificou a me ajudar quando foi preciso.

À minha família, por acreditarem em mim e sempre me apoiarem.

E em especial, ao meu marido Ricardo Tolentino de Souza, que me deu força, tranquilidade e paz para realizar este trabalho. Pela sua paciência, seus ensinamentos, seu reconhecimento e seu imenso amor.

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA-FUNCIONAL DA RECUPERAÇÃO DO ENDOMÉTRIO EQÜINO ATRAVÉS DA INFUSÃO DE NEUTRÓFILOS IMUNOCOMPETENTES CRIOPRESERVADOS, BASEADO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DEFINIDO**

Tese de Doutorado

Autor: Andrea Keller

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

A endometrite é uma importante causa de subfertilidade na égua. Infecções uterinas repetidas ou persistentes poderiam levar ao desenvolvimento de fibrose periglandular. Os objetivos deste trabalho foram avaliar se os processos degenerativos do endométrio são influenciados por infecções bacterianas experimentais sucessivas; realizar uma avaliação histopatológica das biópsias endometriais para documentar os efeitos de diferentes tratamentos sobre o endométrio após infecções experimentais. Foram utilizadas vinte éguas resistentes, com histórico reprodutivo desconhecido, e cinco éguas susceptíveis, com histórico de endometrites recorrentes e subfertilidade. As vinte e cinco éguas foram classificadas nos seguintes grupos, de acordo com o grau de endometrite e endometrose: GI (n=4), GIIA (n=10), GIIB (n=8) e GIII (n=3). Após o primeiro exame histopatológico (amostra pré-infecção), as éguas foram sincronizadas com prostaglandina. Na fase estral, as éguas foram infectadas com  $1 \times 10^9$  *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Constatada a presença de sinais clínicos de endometrite, os grupos de éguas foram distribuídos entre cinco diferentes tratamentos: leucócitos frescos, leucócitos congelados, leucócitos lisados, Interleucina-8 (IL-8) e grupo controle. As éguas foram tratadas diariamente, por, no máximo, quatro dias, ou até que o exame bacteriológico não evidenciasse o crescimento de *Streptococcus*. No quinto dia, as éguas eram submetidas a novo exame histopatológico (amostra pós-infecção) e no sétimo dia, todas as éguas eram tratadas com penicilina, independentemente de terem eliminado a infecção ou não. Sete dias após, as éguas eram novamente submetidas a exame histopatológico e sincronizadas

para realizar uma nova infecção e novo tratamento. As biópsias foram avaliadas quanto à endometrose e endometrite. Não se observaram diferenças significativas entre os graus de endometrose observados antes e no quinto dia após as cinco infecções experimentais. Da mesma forma, não foram observadas variações no grau de endometrose entre as biópsias realizadas antes das infecções, bem como entre as biópsias coletadas no quinto dia após a infecção. Não houve influência dos tratamentos sobre os graus de endometrose durante as 5 infecções experimentais. Entretanto, verificou-se variação significativa entre as diferentes éguas no grau de endometrose das biópsias uterinas coletadas antes e após a infecção experimental. Observou-se, nas éguas resistentes, neutrofilia e eosinofilia significativas nas biópsias do 5º dia pós-infecção, quando comparadas com as biópsias pré-infecção. Nas éguas susceptíveis, somente foi detectada eosinofilia, não se observando aumento do número de neutrófilos. Não houve aumento do número de linfócitos e plasmócitos nas biópsias pós-infecção, quando comparadas às pré-infecção, nas éguas susceptíveis e resistentes. Os tratamentos não influenciaram, nas éguas resistentes e susceptíveis, a migração de neutrófilos no quinto dia, quando comparada com a observada antes da infecção. Conclui-se que infecções experimentais sucessivas durante 13 meses não influenciaram o grau médio de endometrose, apesar da variabilidade ocorrida entre as éguas. Esta variação provavelmente se deva a uma baixa representatividade de uma única amostra de biópsia na avaliação somente do grau de degeneração endometrial. Conclui-se, também, que éguas susceptíveis à endometrite, com presença de *Streptococcus* no útero, não apresentam neutrofilia cinco dias após a infecção. Provavelmente, o menor tempo de eliminação bacteriana observada nos tratamentos com leucócitos frescos e congelados deva-se a outros fatores que não o efeito quimioatraente leucocitário.

Palavras-Chave: égua, endometrose, endometrite, infecção experimental, biópsia endometrial



**ABSTRACT**

**MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL RECUPERATION FROM THE  
EQUINE ENDOMETRIUM THROUGH THE INFUSION OF FROZEN  
IMMUNOCOMPETENT NEUTROPHILS**

Thesis

Author: Andrea Keller

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

*Endometritis is an important cause of subfertility in the mare. Repetitive or persistent uterine infections could lead to the development of periglandular fibrosis. The objectives of this study were: - to evaluate if degenerative endometrial diseases are influenced by repetitive experimental bacterial infections; - to determine the effect of different treatments on the endometrium after experimental infections by means of histopathological evaluation of endometrial biopsies. Twenty resistant mares, with unknown reproductive history, and five susceptible mares, with history of recurrent endometritis and subfertility, were used. Mares were classified, according to the degree of endometritis and endometrosis, within the following groups: GI (n=4), GIIA (n=10), GIIIB (n=8) and GIII (n=3). Cycles were synchronized with prostaglandin after the first histopathological examination (pre-infection sample). During estrus, mares were infected with  $1 \times 10^9$  *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Twenty four hours after the inoculation, clinical, bacteriological and cytological examinations were performed. When endometritis clinical signs were detected, the groups of mares were distributed into five different treatments: fresh leukocytes, frozen leucocytes, lysed leucocytes, Interleukin-8 (Il-8) and control group. Mares were treated on a daily basis for no more than four days, or until there was no *Streptococcus* growth in bacteriological examination. On the fifth day, mares were submitted to a new histopathological examination (post-infection sample) and, on the seventh day, all the mares were treated with penicillin, independently of having eliminated infection, or not. Seven days after, mares were submitted to a new histopathological examination and synchronized in order to proceed to a new infection and a new treatment. Biopsies were evaluated for endometritis and endometrosis. There*

*was no significant difference regarding the degree of endometriosis before and on the fifth day after the five infections. Similarly, there was no difference regarding the degree of endometriosis among biopsies performed before infections and among biopsies performed on the fifth day after infections. Treatments did not influence the degree of endometriosis during the five experimental infections. Anyway, there was a significant variation between different mares, according to the degree of endometriosis, in biopsies collected before, as well as in biopsies collected after experimental infection. Resistant mares showed significant neutrophilia and eosinophilia in biopsies collected on the fifth day after infection, compared to pre-infection samples. Susceptible mares showed eosinophilia, but no growth in neutrophil number. There was no growth in lymphocyte and plasma cell number in post-infection biopsies, if compared to pre-infection biopsies, either in susceptible, or in resistant mares. In the same way, treatments did not influence neutrophil migration on the fifth day post-infection, if compared to pre-infection, either in susceptible, or in resistant mares. It was concluded that repetitive experimental infections do not influence the average degree of endometriosis, in spite of the variability between mares. This variability is probably due to the low representation of one single biopsy sample in the evaluation of the degree of endometrial degeneration. It was also concluded that susceptible mares showing *Streptococcus* in uterus do not present with neutrophil growth five days after infection. The shorter time required for bacterial elimination when fresh and frozen leukocytes were used is probably due to other factors than leukocyte chemoattractive effect.*

*Key words: mare, endometriosis, endometritis, experimental infection, endometrial biopsy*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÚTERO DA ÉGUA.....	12
2.2	BIÓPSIA UTEINA – IMPORTÂNCIA E INDICAÇÕES.....	13
2.3	REPRESENTATIVIDADE DE UMA AMOSTRA.....	14
2.4	CLASSIFICAÇÃO DAS BIÓPSIAS UTERINAS.....	15
2.5	PATOLOGIAS DO ENDOMÉTRIO.....	18
2.5.1	ENDOMETROSE.....	18
2.5.2	ENDOMETRITE.....	21
2.5.2.1	Éguas resistentes e susceptíveis.....	21
2.5.2.2	Secreções uterinas.....	22
2.5.2.3	Limpeza física do útero.....	23
2.5.3.4	Mecanismos celulares de defesa.....	24
2.5.2.5	Acúmulo de fluido intrauterino.....	25
2.5.2.6	A endometrite na biópsia uterina.....	26
2.5.3	ALTERAÇÕES VASCULARES.....	28
2.5.4	DISTÚRBIOS FUNCIONAIS GLANDULARES.....	30
2.5.4.1	Má-diferenciação glandular.....	30
2.5.4.2	Diferenciação ciclo-assíncronica.....	31
2.5.4.3	Assincronia fisiológica.....	31
2.5.4.4	Atrofia.....	31
2.5.4.5	Hiperplasia glandular.....	32
2.5.4.6	Hipoplasia glandular.....	32
2.6	ENDOMETRITE E TRATAMENTOS.....	32
3	ARTIGOS.....	35
3.1	ARTIGO 1. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios .....	35
3.2	ARTIGO 2. 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.....	51
3.3	ARTIGO 3. Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare.....	70
3.4	ARTIGO 4. Effect of repetitive experimental bacterial infections on uterine degeneration in the mare.....	75
4	CONCLUSÕES.....	87
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

## 1 INTRODUÇÃO

Durante a cobertura, o útero da égua é contaminado por bactérias, partículas sólidas e debris celulares, que estimulam uma endometrite aguda, geralmente transitória e resolvida em 72 a 96 horas (HUGHES E LOY, 1969). Algumas éguas, porém, chamadas de susceptíveis à infecção, falham em eliminar as bactérias com a mesma eficiência das éguas saudáveis. A infecção uterina persistente é uma causa comum de subfertilidade na égua.

A susceptibilidade à infecção uterina desenvolve-se gradualmente, ocorrendo por um somatório de fatores, como o aumento da idade, a multiparidade, danos ao trato reprodutivo e exposição constante a bactérias por anormalidades anatômicas da vulva e cérvix, técnicas inapropriadas de manejo reprodutivo, procedimentos ginecológicos e eventos pós-parto (MCKINNON & VOSS, 1993). A resistência à infecção intra-uterina requer uma eficiente limpeza física do útero e uma eficiente mobilização de neutrófilos, que devem estar aptos a realizar a ingestão e lise intracelular das bactérias.

A endometrose é um processo progressivo e irreversível e é uma causa importante de infertilidade na égua. Até hoje, a etiologia e a patogenia da endometrose permanecem desconhecidas (HOFFMANN *et al.*, 2003). Infecções uterinas repetidas ou persistentes poderiam, ao causar inflamação do endométrio, levar ao desenvolvimento da fibrose periglandular (KENNEY, 1975; GORDON e SARTIN, 1978; LEY *et al.*, 1989; CARNEVALE e GINTHER, 1991, CADARIO *et al.*, 2002).

A biópsia uterina é um método diagnóstico auxiliar importante na reprodução eqüina, devendo estar sempre inserida em um contexto clínico. Algumas alterações uterinas, como a fibrose periglandular e as endometrites não purulentas, só são diagnosticáveis através de uma biópsia uterina

A infusão intrauterina de plasma homólogo tem sido utilizada para tratamento de endometrite na égua (ASBURY, 1984; WAELCHLI *et al.*, 1987; ASBURY e LYLE, 1993). Acredita-se que as opsoninas do plasma incrementem a fagocitose das bactérias pelos neutrófilos no útero. Foi preconizada por Castilho (1994) a utilização de infusão de plasma homólogo acrescido de neutrófilos.

O objetivo deste trabalho foi verificar, através da biópsia uterina, a influência de diferentes tratamentos sobre o endométrio e a caracterização da patogênese endometrial nos mecanismos de limpeza uterina. Objetivou-se, também, avaliar se os processos degenerativos do endométrio eram influenciados por infecções bacterianas experimentais sucessivas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ÚTERO NA ÉGUA

O útero da égua é composto por três camadas: endométrio (mucosa), miométrio (muscular) e perimétrio (serosa).

A mucosa do lúmen uterino é revestida por células epiteliais, que variam de cúbicas a cilíndricas altas. Abaixo do epitélio está a lâmina própria, que foi dividida por Kenney (1978) em estrato compacto e estrato esponjoso. O estrato compacto é formado por muitas células do estroma e capilares. No estrato esponjoso encontram-se algumas células do estroma, artérias, veias e vasos linfáticos, bem como as glândulas endometriais. Vogel e Humke (1973) denominam a camada entre o endométrio e o miométrio de estrato subglandular, rico em vasos e pobre em glândulas. O miométrio é formado por uma grossa camada circular interna e uma fina camada longitudinal externa e, entre elas, está o estrato vascular. Sobreposto ao miométrio fica o perimétrio, formado por tecido conjuntivo frouxo, vasos e nervos, coberto por mesotélio peritoneal (DELLMANN e BROWN, 1987).

As características histológicas observadas nas biópsias endometriais podem ser fisiológicas (cíclicas ou estacionais), patológicas ou artefatos (KENNEY, 1978). A interpretação correta de mudanças depende do conhecimento das mudanças cíclicas e estacionais do endométrio. Características cíclicas a serem observadas são: a altura do epitélio luminal, a configuração das glândulas e a quantidade de edema na lâmina própria (DOIG e WAELCHLI, 1993). O ciclo estral da égua tem duração de 18 a 22 dias, tempo entre uma ovulação e outra, e foi dividido por Brunckhorst e Schoon (1990) e Schoon *et al.* (1992) nas seguintes fases:

Proliferativa (8 a 9 dias) ⇒ Pró-estro (3 dias); estro (2-3 dias); pós-estro (3 dias);

Secretória (9 dias) ⇒ inter-estro inicial e intermediário;

Involutiva (4 dias) ⇒ inter-estro final.

Na fase proliferativa, as células do epitélio luminal e do epitélio das glândulas são prismáticas altas, com grande núcleo oval a redondo, hipocromático. As glândulas estão distendidas. Na fase secretória, as células do epitélio luminal são isoprismáticas a cúbicas, com núcleo oval a redondo. As glândulas são tortuosas, o lúmen é maior e seu epitélio é baixo, com vacúolos secretórios na parte apical do citoplasma e núcleo redondo. Na fase involutiva as células epiteliais das glândulas tem núcleo pequeno, redondo e hiperchromático, localizado na membrana basal. As glândulas começam a perder a tortuosidade (BRUNCKHORST *et al.*, 1991).

## **2.2 BIÓPSIA UTERINA – IMPORTÂNCIA E INDICAÇÕES**

A biópsia uterina faz parte do exame ginecológico para avaliar a capacidade reprodutiva da égua. Sua maior importância consiste na determinação da capacidade do útero em levar uma gestação a termo, sempre relacionada aos achados clínicos (quadro vaginal, exame ecográfico), laboratoriais (exames citológico e bacteriológico) e outros dados, como idade, número de crias e comportamento. A técnica também é útil em detectar mudanças associadas com baixa fertilidade, não facilmente diagnosticadas por outros métodos e na monitoração da resposta à uma terapia uterina específica (DOIG e WAELCHLI, 1993). A biópsia endometrial é indicada em qualquer égua não gestante com suspeita de alguma alteração uterina.

A biópsia uterina é indicada nas seguintes situações, segundo Kenney (1978):

1. Constatação de problemas do trato genital;
2. Infertilidade após inseminações/coberturas em três ou mais ciclos numa mesma temporada de monta, com sêmen de comprovada fertilidade;
3. Éguas com histórico de perda embrionária precoce ou aborto;
4. Comportamento de anestro durante a temporada fisiológica de monta, bem como hipoplasia de ovários e genitália;
5. Antes e depois de uma intervenção cirúrgica no trato genital;
6. Casos de piômetra e mucômetra;
7. Avaliação de fertilidade;

#### 8. Monitoração dos resultados de uma terapia uterina.

A retirada da amostra uterina pode ser feita em qualquer fase do ciclo estral (KENNEY, 1977; KENNEY E DOIG, 1986), sem causar problemas clínicos. Segundo Neely (1983), porém, para uma avaliação correta do grau de fibrose endometrial, o diestro é a melhor fase do ciclo para a coleta da amostra, pois o útero, sob influência luteal, apresenta maior concentração de glândulas. Um endométrio em anestro é hipoplásico e subdesenvolvido, sendo difícil a avaliação da fibrose. Da mesma forma, durante o estro, as glândulas estão presentes em menor quantidade, separadas pelo edema, que pode ser consequência da influência do estrógeno ou de uma inflamação (neste caso acompanhado de células inflamatórias). Gross e LeBlanc (1984) coletaram amostras mensais do endométrio de éguas durante um ano e observaram que as mudanças sazonais refletiam sobre o estroma e glândulas, influenciando a avaliação quantitativa das glândulas, o que resultava na mudança de classificação da endometrose.

Retiradas repetidas de amostras não têm efeito negativo sobre a taxa de parição, segundo Watson e Sertich (1992) que coletaram biópsias endometriais de éguas duas, três ou quatro vezes num período de 50 dias, inclusive durante os dias de cobertura, e observaram que seis das sete éguas estudadas ficaram prenhes.

### **2.3 REPRESENTATIVIDADE DE UMA AMOSTRA**

Apesar de uma amostra de biópsia uterina compreender apenas 0,1% de toda a superfície endometrial (KENNEY, 1975), ela é representativa quando as alterações patológicas são difusamente distribuídas (BERGMAN e KENNEY, 1975; WAELCHLI e WINDER, 1989). Quando existem alterações localizadas, percebidas no exame clínico, a amostra deve ser retirada destes locais (KENNEY, 1977; SCHOON *et al.*, 1994 ). Ricketts e Alonso (1991a) indicam a coleta de duas biópsias uterinas, uma antes e outra depois de um tratamento uterino específico, levando em conta a capacidade da égua em responder ao tratamento, tendo assim um melhor prognóstico reprodutivo.



As fibroses (endometrose), segundo Runge (1995) e Schoon *et al.* (1995), são mais comuns no corpo do útero. Já para Blanchard *et al.* (1987), que coletaram amostras de 12 locais diferentes do útero de 5 éguas, não existe diferença na distribuição das lesões fibróticas no endométrio. Vários autores concordam que as alterações inflamatórias distribuem-se uniformemente pelo útero (BERGMAN e KENNEY, 1975; BLANCHARD *et al.*, 1987; RUNGE, 1995). As amostras retiradas da cérvix não são representativas (BLANCHARD *et al.*, 1987; RUNGE, 1995). A densidade glandular é menor na área perto da cérvix, não devendo ser interpretada como atrofia por desequilíbrio hormonal, pois é uma particularidade anatômica da égua (BLANCHARD *et al.*, 1987).

#### 2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS BIÓPSIAS UTERINAS

Na análise para classificação das biópsias uterinas são levadas em conta as alterações inflamatórias, degenerativas, lacunas linfáticas e funcionalidade do endométrio (atrofia durante a temporada fisiológica de monta).

A primeira classificação de biópsias uterinas foi proposta por Ricketts (1975), que não estabeleceu relação com o prognóstico reprodutivo. Em 1978, Kenney formulou um esquema de classificação dividido em 3 categorias de comprometimento endometrial: categoria I: normais; categoria II: comprometimento médio; categoria III: severamente afetadas. Mais tarde, Kenney e Doig (1986) subdividiram a categoria II em A e B, com o seguinte prognóstico reprodutivo (considerando-se a capacidade de levar a gestação a termo):

Categoria I: 80 – 90%

Categoria IIA: 50 – 80%

Categoria IIB: 10 – 50%

Categoria III: 10%

Silva *et al.* (1987) analisaram as biópsias endometriais e as taxas de concepção de 168 éguas da raça Puro Sangue de Corrida num período de 5 anos. As éguas classificadas no grupo I (73,8%), apresentaram 69,4% de taxa de concepção e 4,6% de perdas embrionárias. As éguas do grupo II (19,1%), apresentaram 44% de taxa de concepção e

14,3% de perdas gestacionais. As éguas classificadas no grupo III (7,1%), apresentaram 25% de concepção e 33,3% de perdas gestacionais. Os autores concluem que as alterações histopatológicas do endométrio têm relação com a capacidade reprodutiva e que a biópsia endometrial é um valioso auxiliar na avaliação do prognóstico de fertilidade na égua.

Para Schoon *et al.* (1997), apesar das medidas terapêuticas limitadas, especialmente nas lesões endometriais subclínicas, atrelar o prognóstico reprodutivo de uma égua apenas à atual categorização endometrial é um erro inaceitável do ponto de vista médico. Por exemplo, uma égua classificada no grupo I não significa que ela seja fértil, mas sim que seu endométrio não possui nenhum achado morfológico que possa diminuir sua fertilidade. Da mesma forma, uma égua classificada no grupo III não significa que ela seja infértil. Ainda, para estes autores, uma amostra de biópsia uterina deveria vir acompanhada de várias informações sobre os achados ginecológicos, bacteriológicos, endocrinológicos e anamnese, para uma correta avaliação do prognóstico reprodutivo e possível reversibilidade de algum processo.

A Tabela 1 mostra a comparação entre três autores e as diferenças na definição das categorias de comprometimento endometrial.

Tabela 1 – Comparação entre três autores quanto à classificação das biópsias endometriais

<b>Kenney 1977, 1978</b>	<b>Kenney e Doig, 1986</b>	<b>Schoon <i>et al.</i>, 1992</b>
<b>Grupo I</b> -nenhuma alteração ou alterações leves	<b>Grupo I</b> -nenhuma alteração ou alterações leves -sem atrofia ou hipoplasia	<b>Grupo I</b> - sem alteração - focos leves e isolados de fibrose e inflamação
<b>Grupo II</b> - leve a moderada infiltração difusa no estrato compacto ou focos isolados no estrato compacto e esponjoso - até 3 ninhos de fibrose / 5,5 mm (contar no mínimo 4 campos) - disseminadas lacunas linfáticas ou alterações palpáveis na parede do útero - atrofia do endométrio	<b>Grupo IIA</b> - leve a moderada infiltração inflamatória difusa no estrato compacto ou focos freqüentes no estrato compacto e esponjoso - numerosas glândulas c/ fibrose (1-3 camadas de fibrose) ou > 2 ninhos/5,5mm - lacunas linfáticas que causem alterações palpáveis na parede uterina - atrofia parcial durante a temporada de monta	<b>Grupo IIA</b> - leve a moderada infiltração inflamatória difusa no estrato compacto - numerosos focos disseminados no estrato compacto e esponjoso. - leve a moderada fibrose periglandular disseminada e ninhos fibróticos (1-3 camadas; >2 focos/5mm) - lacunas linfáticas leves - atrofia parcial durante a temporada de monta
	<b>Grupo IIB</b> - éguas do GIIA que estão vazias há mais de 2 anos - combinação de 2 ou mais achados do GIIA - endometrite moderada difusa ou focal - fibrose periglandular (> 4 cam.) moderada e igualmente distribuída ou - 2-4 ninhos/ 5,5mm -campo	<b>Grupo IIB</b> - éguas do GIIA que estão vazias há mais de 2 anos - combinação de 2 achados do GIIA - moderada difusa ou grave focal infiltração de cél. inflamatórias - fibrose periglandular e ninhos (5-10 cam.; 2-4 ninhos/5mm) moderada e igualmente distribuída - moderadas lacunas linfáticas
<b>Grupo III</b> - moderada a grave endometrite com presença de plasmócitos - grave fibrose (> 5 ninhos / 5,5 mm) - lacunas linfáticas que causem alterações palpáveis à parede do útero	<b>Grupo III</b> - combinação de 2 ou mais achados do GIIB - moderada a grave endometrite com presença de plasmócitos - fibrose disseminada (>5 ninhos/5,5mm) - graves lacunas linfáticas - atrofia total durante a temporada de monta	<b>Grupo III</b> - combinação de 2 achados do GIIB - grave e difusa infiltração de cél. inflamatórias - fibrose periglandular e ninhos (>10 cam.; >4focos/5mm) grave e igualmente distribuída - lacunas linfáticas graves (palpáveis via retal) - atrofia durante a temporada de monta

## 2.5 PATOLOGIAS DO ENDOMÉTRIO

### 2.5.1 ENDOMETROSE

O termo endometrose passou a ser utilizado em 1992, por proposição de Kenney, substituindo o termo “endometrite degenerativa crônica” (RICKETTS 1975). Kenney incluiu no conceito de endometrose 14 diferentes alterações patológicas do útero. Além da fibrose, estariam incluídos os acúmulos de linfa, adesões transluminais, formação de divertículos e os efeitos de uma urovagina sobre o útero. Em contrapartida, Schoon *et al.*(1995) sugeriram que o termo endometrose englobasse apenas a fibrose periglandular e/ou do estroma endometrial e as alterações glandulares dentro das áreas de fibrose. Segundo estes autores, as alterações, como disfunções glandulares fora das áreas de fibrose, anomalias de função glandular (atrofia, hipoplasia) e angiopatias, devem ter um registro à parte e, após o esclarecimento de sua relevância no prognóstico reprodutivo, deveriam ser incluídas em um sistema de classificação endometrial modificado.

A endometrose é um processo progressivo e irreversível, está correlacionada com a idade e é agravada por agressões freqüentes como coito, infecções ou gestação (RICKETTS e ALONSO, 1991b). Até hoje, a etiologia e a patogenia da endometrose permanecem desconhecidas (HOFFMANN *et al.*, 2003). Feixes periglandulares de colágeno e camadas concêntricas de fibroblastos e fibrócitos caracterizam o início da endometrose, cujos estágios mais precoces não podem ser reconhecidos por microscopia óptica (RAILA *et al.*, 1997). Infecções uterinas repetidas ou persistentes poderiam, ao causar inflamação do endométrio, levar ao desenvolvimento da fibrose periglandular (KENNEY, 1975; GORDON e SARTIN, 1978; LEY *et al.*, 1989; CARNEVALE e GINTHER, 1992, CADARIO *et al.*, 2002). Com base em estudos sobre a expressão de citocinas na patogenia de fibrose patológica em outros tecidos, Cadario *et al.* (2002) investigaram citocinas fibrogênicas no endométrio da égua. As citocinas TGF- $\beta$ 1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , apresentaram grande variabilidade entre as éguas e não foi encontrada diferença significativa na sua expressão em éguas com fibrose grave, comparada a éguas com fibrose moderada ou com ausência de fibrose. Outros estudos demonstraram um padrão

deficiente de secreção de proteínas no endométrio de éguas com endometrose e éguas com endometrite e endometrose (BADER *et al.*, 1997; HEIN, 2000).

O grau de endometrose é determinado pela frequência de glândulas com fibrose e formação de ninhos (DISCRETO= $\leq 2$ /campo; MODERADO=2-4/campo; SEVERO= $\geq 4$ /campo) e pelo número de camadas de fibrose (DISCRETO =1-3; MODERADO =4-10; SEVERO= $\geq 10$  camadas) (KENNEY, 1978; KENNEY e DOIG, 1986; SCHOON *et al.*, 1992).

A fibrose periglandular difusa, independentemente do grau de severidade, tem um maior efeito nocivo na capacidade do útero em levar uma gestação a termo que alterações localizadas. Por isso, a frequência com que aparecem os ninhos de fibrose é um fator importante na classificação do grau de endometrose (KENNEY, 1978).

Flores *et al.* (1995) constataram, em éguas com grau leve de endometrose, apenas 5% de endometrite concomitante, enquanto em éguas com grau médio a severo de endometrose este valor subiu para 30%.

Pimentel *et al.* (comunicação pessoal, 2004) avaliaram biópsias uterinas de 92 éguas da raça Crioula que ficaram vazias após uma temporada de monta. Foi observado que 30,4% das éguas não apresentaram alterações no útero, apenas 7,6% das éguas apresentaram endometrose, combinações de inflamação e degeneração endometrial ocorreram em 30,4% e somente alterações inflamatórias em 31,5%.

Em trabalho publicado em 1995, Schoon *et al.* resumem os achados de biópsias uterinas de 585 éguas, com idades variando de 3 a 27 anos, na rotina diagnóstica do Instituto de Patologia de Leipzig: 61% das éguas apresentaram endometrose, sendo que, destas 66% de grau leve, 30% de grau médio e 4% de grau severo; 32,6% das éguas com endometrose apresentavam endometrite concomitante; 5,3%, lacunas linfáticas; 1,4%, atrofia glandulares (durante a estação de monta).

Foi encontrada uma forte correlação entre a presença de endometrose e a idade das éguas, independentemente do número de potros que elas tivessem parido: das éguas com menos de 9 anos, 30% apresentaram endometrose, nenhuma de grau severo; das éguas de 9 a 14 anos, 60% apresentaram endometrose; das éguas com mais de 14 anos, 90% apresentaram endometrose.

Correlacionando o grau de endometrose e o número de potros nascidos, 45% das éguas com grau leve de endometrose levaram a gestação a termo, enquanto 32% com grau médio e 0% com grau severo levaram a gestação a termo.

Foi encontrada, também, forte correlação entre o grau de endometrose e o tempo em que as éguas permaneceram vazias: 72,6% das éguas vazias há 1 ano e 95,4% das vazias há mais de 2 anos apresentaram endometrose; apenas 32% das éguas com histórico de potros nascidos apresentaram endometrose. Leishman *et al.* (1982) compararam biópsias uterinas de éguas problema e de éguas “normais” e não encontraram diferenças significativas na altura do epitélio, na presença de células inflamatórias e no número de camadas de fibrose periglandular nas camadas superficiais do endométrio. Porém, o número de camadas de fibrose periglandular nas camadas mais profundas da lâmina própria teve correlação positiva com os anos em que as éguas estavam vazias.

A formação de ninhos glandulares não fibróticos é descrita por vários autores. Segundo Gross e Le Blanc (1984) e Kenney e Doig (1986), estes ninhos ocorrem em camadas mais profundas do útero nas fases de anestro e transicional. Uma agregação glandular semelhante ao ninho fibrótico também pode ser observada no pré-estro, como resultado de uma edemaciação irregular do estroma endometrial (KENNEY, 1978; KENNEY e DOIG, 1986; SCHOON *et al.* 1992).

A endometrose é um processo progressivo e irreversível. Vários tratamentos propostos na tentativa de realizar uma curetagem química, não obtiveram sucesso na redução do processo fibrótico ou na melhoria da fertilidade (ASBURY e LYLE, 1993; BRACHER, 1992; SCHOON *et al.*, 1995). Porém, alguns autores descrevem reversão parcial da fibrose periglandular após curetagem do endométrio (RICKETTS, 1985; RICKETTS e BARRELET, 2001), uso de infusão de querosene (ROBERTS, 1992) e de DMSO (LEY *et al.*, 1989).

## **2.5.2 ENDOMETRITE**

A endometrite é um estado inflamatório agudo ou crônico do endométrio. Esta situação pode ocorrer associada a uma infecção bacteriana ou não (KENNEY, 1992). Éguas susceptíveis à infecção uterina crônica representam a maioria dos problemas de infertilidade e subfertilidade na reprodução eqüina (TROEDSSON *et al.*, 1993c). A contaminação que ocorre na inseminação ou cobertura precisa ser eliminada pela égua em até 96 horas (LEBLANC *et al.*, 1994) pois o embrião chega ao lúmen uterino no 5º ou 6º dia após a fertilização (FREEMAN *et al.*, 1992). A presença de fluido, bactérias e produtos inflamatórios pode prejudicar o transporte do espermatozóide e a fertilização (REILAS, 2001) e pode ser incompatível com a sobrevivência do embrião (WAITES e BELL, 1982). Uma inflamação persistente geralmente resulta em luteólise prematura e perda embrionária, devido a concentrações aumentadas de prostaglandina (NEELY *et al.*, 1979).

### **2.5.2.1 Éguas resistentes e susceptíveis**

O conceito de susceptibilidade à endometrite foi primeiramente sugerido por Farrelly e Mullaney (1964) e vem sendo discutido desde então, mas o conceito de endometrite persistente pós-cobertura é mais recente (TROEDSSON, 1997). A susceptibilidade à infecção uterina desenvolve-se gradualmente, pelo somatório de diversos fatores, como aumento da idade, vários partos, má condição corporal, danos ao trato reprodutivo e exposição constante a bactérias por anormalidades anatômicas da vulva e cérvix, técnicas inapropriadas de manejo reprodutivo, procedimentos ginecológicos e eventos pós-parto (MCKINNON & VOSS, 1993). Os mecanismos de defesa uterina podem ser divididos em físicos e celulares. Os físicos são as barreiras físicas (vulva, prega vestibulo-vaginal, cérvix) e contratilidade miometrial e os celulares são a resposta imunológica local iniciada pelo útero. As éguas resistentes conseguem eliminar facilmente a contaminação bacteriana do útero. As éguas susceptíveis apresentam falhas nos mecanismos de defesa uterina e permanecem continuamente

infectadas. Troedsson *et al.* (1993a) investigaram a relação entre as lesões endometriais observadas na biópsia e a susceptibilidade à infecção uterina. Vinte e cinco éguas foram divididas em 4 grupos, de acordo com o grau de lesão do endométrio (GI, GIIa, GIIb e GIII). As éguas foram inoculadas com *Streptococcus zooepidemicus*, e aquelas éguas com exames bacteriológico e citológico positivos 96 horas após a infecção eram consideradas susceptíveis. As éguas do GI (histologicamente normais) tiveram correlação positiva com a resistência à infecção bacteriana. As éguas do GIII (alterações histológicas severas) tiveram correlação positiva com a susceptibilidade à infecção. Porém, as éguas dos grupos IIa (alterações leves) e IIb (alterações moderadas) não puderam ser classificadas nem como resistentes, nem como susceptíveis. A classificação de uma égua como resistente ou susceptível pode ser feita a partir de um conjunto de observações e acompanhamento durante a temporada de monta ou a partir da sua resposta à uma infecção experimental.

#### **2.5.2.2 Secreções uterinas**

O fluido uterino é formado por hormônios, prostaglandinas, enzimas, substratos energéticos, íons, vitaminas, aminoácidos, peptídeos, proteínas séricas e proteínas uterinas (FISHER e BEIER, 1986). Os hormônios controlam a atividade secretória do útero, tanto em qualidade, quanto em quantidade (REILAS, 2001). Até sua implantação, o embrião é mantido apenas pelas secreções que se acumulam no lúmen uterino, um fenômeno chamado nutrição histotrófica (ASHWORTH, 1995). Na égua, a implantação e a placentação ocorrem bem mais tarde que em outras espécies, tornando a nutrição histotrófica particularmente importante. Mudanças no ambiente uterino durante o puerpério, inflamação e nos diferentes estágios do ciclo estral não são bem conhecidos no eqüino (REILAS, 2001).

Além de proteínas e enzimas séricas, as secreções uterinas contêm uma variedade de proteínas sintetizadas e secretadas pelas células uterinas (REILAS, 2001). Algumas destas proteínas já foram identificadas na égua. Bader *et al.* (1997) encontraram, na fase luteal, as proteínas fosfolipase A2 (17 kDa), uteroglobina (< 6,5 kDa) e uma terceira, de



22 kDa, que não foi identificada. Em outro experimento dos mesmos autores, comparando um grupo de éguas virgens (biópsia GI e GIIA) e outro de éguas subfêrteis (biópsia GIIB e GIII), 90% das éguas subfêrteis mostraram um padrão deficiente de proteínas nas bandas de 17 e 22 kDa. Num estudo semelhante, Hein (2000) encontrou as mesmas bandas de proteínas na fase luteal (17, 21 e < 6,5 kDa). O autor encontrou também, com mais frequência em éguas com endometrose e éguas com endometrite e endometrose, um padrão deficiente de proteínas, quando comparado com éguas genitalmente sadias.

O endométrio tem a capacidade de desenvolver uma resposta imune local, com produção e secreção seletiva de imunoglobulinas A e G. Estudos têm sido feitos sobre a concentração de imunoglobulinas na secreção uterina. Widders *et al.* (1985) encontraram níveis mais altos de IgG e IgA na fase estral que na fase luteal. Asbury *et al.* (1980) encontraram maior concentração de imunoglobulinas no útero de éguas susceptíveis que de éguas resistentes. Troedsson *et al.* (1993c) compararam éguas susceptíveis e resistentes quanto à concentração de imunoglobulinas e fração do complemento C3 nas secreções uterinas, após inoculação com *Streptococcus zooepidemicus*. Após observarem que não houve diferença na concentração de IgA, IgG e C3 entre os dois grupos, durante as primeiras 24 horas após a infecção, concluíram que a falha na defesa uterina de éguas susceptíveis não se deve à deficiência local de imunoglobulinas.

### **2.5.2.3 Limpeza física do útero**

A limpeza deficiente do útero durante o estro é a maior causa de endometrite recorrente na égua (TROEDSSON e LIU, 1991). Éguas velhas e susceptíveis têm uma disfunção mecânica na limpeza de produtos do útero e acumulam fluidos após inoculação de bactérias durante o estro (LEBLANC *et al.*, 1989). Troedsson *et al.* (1993b) observaram uma atividade miométrial semelhante em éguas susceptíveis e resistentes nas primeiras 6 a 8 horas após inoculação com *Streptococcus zooepidemicus*, que diminuiu após este período nas éguas susceptíveis. A demora na limpeza de sub-produtos da inflamação permite a aderência das bactérias ao endométrio (LEBLANC *et al.*, 1994).

Durante o diestro, quando a cérvix está fechada, é provável que os vasos linfáticos façam a reabsorção de algum fluido ou partícula remanescente no útero (LEBLANC *et al.*, 1995). As contrações do miométrio facilitam esta drenagem, ao comprimir os vasos linfáticos, que movem o fluido em direção aos linfonodos (GUYTON, 1991). LeBlanc *et al.* (1995) infundiram nanquim no útero de éguas resistentes e susceptíveis durante o diestro e verificaram uma drenagem linfática mais lenta nas éguas susceptíveis.

#### 2.5.2.4 Mecanismos celulares de defesa

Em éguas clinicamente saudáveis, a infiltração de neutrófilos para o endométrio e lúmen uterino parece ser responsável pela remoção inicial de bactérias invasoras (LIU e CHEUNG, 1986). Além da infiltração de neutrófilos, ocorre um influxo de proteínas séricas e o endométrio tem a capacidade de desenvolver uma resposta imune típica, com produção e secreção seletiva de imunoglobulinas A e G (WIDDERS *et al.*, 1985).

Os leucócitos, em especial os neutrófilos polimorfonucleares, migram do vaso sanguíneo para o tecido adjacente e, dele, para o sítio da inflamação. Estudos feitos em câmaras quimiotáticas constataram que neutrófilos polimorfonucleares das secreções uterinas de éguas susceptíveis têm menor capacidade de migrar e fagocitar bactérias, quando comparados com éguas resistentes (LIU *et al.*, 1985; WATSON *et al.*, 1987). Mais tarde, Troedsson *et al.* (1993d) sugeriram que a fagocitose deficiente pelos neutrófilos seria resultado da influência negativa das secreções uterinas de éguas susceptíveis, que seriam mais pobres em opsoninas que as secreções uterinas de éguas resistentes à endometrite.

A migração de neutrófilos da corrente sanguínea para os tecidos é um processo importante da inflamação. Deficiências na função, migração, ingestão e lise intracelular dos neutrófilos podem ser a causa de infecções bacterianas resistentes a tratamentos (BRENNEIS e HÄNSCH, 1993). Com o objetivo de investigar os mecanismos patogênicos da endometrite aguda na égua e na vaca, Zerbe *et al.* (2003b) desenvolveram um modelo *in vivo* para atrair neutrófilos para o útero, através da infusão de interleucina recombinante humana (rhIL-8). O pico de neutrófilos uterinos foi obtido 6 horas após a

infusão, tanto nas éguas quanto nas vacas. Este modelo permite a análise da migração dos neutrófilos sob condições definidas e controladas.

#### **2.5.2.5 Acúmulo de fluido intrauterino**

O acúmulo de fluido intraluminal, tanto no estro como no diestro tem sido associado à diminuição nas taxas de prenhez e na fertilidade (ALLEN e PYCOCK, 1988; PYCOCK e NEWCOMBE, 1996). O diagnóstico da presença de líquido no útero é facilmente realizado por ultra-sonografia. O grau de ecogenicidade do líquido indica a presença de debris e neutrófilos (MCKINNON *et al.*, 1988). A pouca drenagem através da cérvix (TROEDSSON e LIU, 1991) e do sistema linfático (LEBLANC, 1994) tem sido apontada como causa do acúmulo de fluido intraluminal. A presença de fluido pode ser um meio ideal para o desenvolvimento de bactérias e pode afetar diretamente os espermatozoides (SQUIRES *et al.*, 1989). Éguas que acumulam fluido durante o estro são consideradas susceptíveis à endometrite (ALLEN e PYCOCK, 1988).

O acúmulo de líquido no útero não precisa ser necessariamente de origem inflamatória. Reilas (2001) observaram baixa concentração de proteínas em fluidos uterinos anecóicos durante o estro, sugerindo ser este acúmulo de transudato fruto do aumento da permeabilidade dos vasos que ocorre na fase estrogênica, pois também não houve diminuição da taxa de recuperação de embriões neste grupo. O fluido pode originar-se, também, de secreções aquosas produzidas pelas glândulas endometriais (LIU, 1992), ou de muco de células epiteliais em resposta a estímulos hormonais ou inflamatórios / irritativos (FREEMAN *et al.*, 1990). Reilas (2001) encontrou correlação entre o acúmulo de fluido no útero e o grau de endometrose. Há suspeitas de que a fibrose endometrial, bem como a diminuição da capacidade de contração do miométrio, prejudiquem a drenagem dos vasos linfáticos (LEBLANC, 1994). Para Reilas (2001) as lacunas linfáticas foram um achado bastante comum em biópsias uterinas coletadas no estro e não foi encontrada correlação com o acúmulo de fluido intrauterino. Os autores concluem, ainda, que um pequeno acúmulo de líquido anecóico durante o estro não

diminui as taxas de concepção e está associado com mudanças na composição das secreções uterinas.

Özgen *et al.* (1997) observaram que as éguas que acumulavam líquido no útero tinham menor concentração plasmática de progesterona durante o diestro. A menor influência de progesterona sobre o endométrio durante a fase luteal leva a um excesso na expressão de receptores de estrogênio e progesterona, devido a falta de *feedback* negativo. Esta desregulação hormonal poderia levar a uma atividade hiper-secretória das glândulas endometriais, causando acúmulo de fluido no útero. Os mesmos autores observaram, também, que as glândulas endometriais das éguas que acumulam líquido têm maior densidade e diâmetro.

#### **2.5.2.6 A endometrite na biópsia uterina**

Como endometrite caracteriza-se a infiltração celular no endométrio que ultrapassa em quantidade e qualidade a infiltração que ocorre na limpeza fisiológica do útero durante o ciclo estral da égua, independentemente da sua etiologia (infecciosa, não infecciosa) (KENNEY, 1992; SCHOON *et al.*, 1992).

Na endometrite aguda, ocorre a dominância de neutrófilos polimorfonucleares e também de eosinófilos no estrato compacto e entre as células do epitélio luminal, migrando para o lúmen uterino. Pode ocorrer, também, uma descamação do epitélio luminal (endometrite erosiva) (RICKETTS, 1975; KENNEY, 1978; KENNEY & DOIG, 1986). Em casos severos, neutrófilos podem ser encontrados em camadas mais profundas da lâmina própria. Glândulas dilatadas contendo neutrófilos degenerados podem ser encontradas em endometrites agudas de qualquer grau de severidade (DOIG e WAELCHLI, 1992). Regularmente, após inseminação ou cobertura, ocorre uma endometrite transitória leve. Em éguas classificadas como resistentes esta inflamação desaparece em 2 ou 3 dias (SCHOON *et al.*, 1997). Porém, se houver uma falha nos mecanismos de defesa uterina, esta inflamação pode persistir e dificultar a prenhez pela produção de substâncias embriotóxicas (ASBURY e LYLE, 1993).

Na endometrite crônica dominam os linfócitos e plasmócitos, não sendo tão frequentes macrófagos, eosinófilos e mastócitos. As infiltrações celulares crônicas aparecem de forma difusa ou focal no estrato compacto e no estrato esponjoso (periglandular e perivascular) (RICKETTS, 1975; KENNEY, 1978; KENNEY & DOIG, 1986). A endometrite crônica pode ser encontrada em associação com uma endometrite aguda (DOIG e WAELCHLI, 1993). As endometrites crônicas não são diagnosticadas por exame clínico e citológico e o exame bacteriológico é negativo na maioria das vezes. Schoon *et al.* (1997) classificam esta forma de endometrite como uma das principais causas de infertilidade sem manifestações clínicas na égua, sendo o principal achado em 15% das éguas vazias, e 20% cursando junto com endometrose. A endometrite crônica é parcialmente reversível com os tratamentos adequados e seu prognóstico depende do grau e da extensão das lesões. Porém, segundo Ricketts e Barrelet (1997), baseados numa retrospectiva de 4241 biópsias endometriais coletadas num período de 25 anos, a infiltração de células mononucleares desenvolve-se no estroma endometrial como reflexo de uma resposta imune local a proteínas do plasma seminal, micro-organismos, debris e produtos da prenhez, durante a vida da égua. Para os autores, estas células infiltrativas crônicas não causam diminuição na fertilidade e o quadro não necessita de tratamento.

Os mecanismos de defesa uterinos incluem a resposta imune natural e a adaptativa. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra infecções bacterianas. Tunón *et al.* (2000) procuraram demonstrar que a imunidade mediada por células também tem um papel importante na endometrite pós-cobertura. Para tanto examinaram a distribuição de células T auxiliares (CD4+) e células T citotóxicas (CD8+) em biópsias uterinas, antes da inseminação, 6 e 48 horas após. Foi observado um aumento no número de células T auxiliares no corpo do útero nas 6 e 48 horas após a inseminação. Watson e Thomson (1996) estudaram a ocorrência de linfócitos no endométrio de éguas genitalmente sadias e encontraram maior quantidade de linfócitos CD4+ e CD8+ no estrato compacto que no estrato esponjoso. Muito poucos plasmócitos foram encontrados no endométrio. O número de linfócitos e plasmócitos não foi influenciado pela fase do ciclo estral, mas aumentou significativamente em éguas com endometrite. Segundo estes autores, é importante reconhecer a prevalência de linfócitos e plasmócitos em número moderado no endométrio de éguas férteis. Estas células não estariam necessariamente

associadas à estimulação antigênica ativa, mas formariam uma parte do mecanismo de defesa da mucosa.

A causa da infiltração eosinofílica não foi ainda esclarecida (SCHOON *et al.*, 1997). Uma das causas prováveis seria a pneumovagina e a infecção uterina por fungos (HURTGEN e CUMMINGS, 1982; SLUSHER *et al.*, 1984). Segundo Schoon *et al.* (1997) os eosinófilos devem ser tratados como um caso a parte, onde a influência hormonal ou sensibilidade individual estão envolvidos. Blüthgen (2001) encontrou eosinófilos em 41,2% das biópsias endometriais sem nenhuma outra alteração, deduzindo ser fisiológico o seu aparecimento no endométrio da égua. Segundo a autora, os eosinófilos aparecem no estrato compacto com mais frequência durante o estro e estão mais frequentemente associados a endometrites agudas do que a crônicas.

### **2.5.3 ALTERAÇÕES VASCULARES**

A parede dos vasos sanguíneos é composta de 3 camadas: íntima (túnica interna), média (túnica média) e adventícia (túnica externa). A íntima compreende o endotélio e a membrana elástica interna em artérias maiores. A média contém células musculares chatas circundadas por quantidades variáveis de fibras elásticas e colágenas. A adventícia é formada por uma rede de fibras elásticas, que tem contato com os outros tecidos ao seu redor (LIEBICH, 1993). Na égua, pode-se diferenciar no endométrio pequenas a médias artérias, arteríolas, capilares, vênulas e pequenas veias (KRIESTEN, 1995). A morfologia dos vasos uterinos não varia com as mudanças cíclicas da égua (STEIGER, 2002).

As angiopatias degenerativas são um achado comum na rotina diagnóstica de biópsias uterinas, estando presentes em mais de 80% dos casos. Alterações degenerativas em artérias e veias incluem elastoses, fibroses e fibrelastoses da parede dos vasos, bem como fibrose perivascular e calcificações (SCHOON *et al.*, 1999a). Vasos com uma estrutura sem alterações aparecem apenas em éguas jovens nulíparas (SCHOON *et al.*, 1997). A etiopatogenia das angioses está relacionada com a idade e com o número de partições. Éguas velhas nulíparas apresentam peri-escleroses e íntima-escleroses leves, enquanto éguas múltiparas apresentam alterações em todas as camadas, muitas vezes com

caráter destrutivo. A incidência de angioses moderadas e graves está positivamente correlacionada com o número de partições. A incidência de angioses moderadas e severas diminui em éguas vazias há mais de dois anos, com menos de 18 anos, o que indica uma capacidade regenerativa dos vasos, que se reduz com o avanço da idade (SCHOON *et al.*, 1999a).

As angiopatias estão relacionadas com a diminuição da fertilidade. Éguas sem endometrose, mas cujo endométrio apresenta arteriosclerose severa, têm uma taxa de paridade inferior às éguas sem angiopatias ou com lesões leves, o que indica que um suprimento arterial deficiente e má-perfusão endometrial podem influenciar negativamente a prenhez. Alterações venosas do endométrio levam a distúrbios de drenagem que afetam secundariamente os vasos linfáticos, já que estes não apresentam alterações morfológicas na sua parede (SCHOON *et al.*, 1999a). O sistema linfático pode ser importante na remoção de partículas e resíduos inflamatórios que permanecem no útero após o fechamento da cérvix. Possivelmente exista uma associação entre a limpeza física do útero através da cérvix e a drenagem linfática na remoção do edema uterino observado durante o cio (LEBLANC *et al.*, 1995). A linfangiectasia forma-se por drenagem insuficiente do edema de cio e, na maioria das vezes, é acompanhado por fleboses severas e parcialmente obliterativas (SCHOON *et al.*, 1999a). A prenhez causa enormes mudanças no miométrio, que precisa adaptar-se e estender-se de centímetros a metros durante os 11 meses de gestação (ROSSDALE, 1997). Bracher *et al.* (1997) afirmam que a extensão da parede uterina, após múltiplas gestações, diminui sua capacidade de contração, resultando em estase linfática e formação de lacunas linfáticas e fibrose.

Schoon *et al.*, (1997) encontraram uma forte correlação entre a presença de angiopatias e endometrose, sugerindo que uma drenagem e perfusão endometrial deficientes possam ser uma das causas importantes da progressão da endometrose.

As alterações inflamatórias mais comuns dos vasos do endométrio são as perivasculites por linfócitos e plasmócitos. Elas podem ocorrer junto com uma endometrite ou isoladas, e não têm correlação com idade ou tempo de atividade em reprodução. Geralmente as veias e capilares são atingidos (KENNEY, 1978; SCHOON *et al.*, 1994). Não foi demonstrada ainda uma influência direta da perivasculite sobre a

fertilidade (KRIESTEN, 1995). As vasculites são raras (1,7%) em éguas e foram encontradas somente no puerpério (GRÜNINGER, 1996).

## **2.5.4 DISTÚRBIOS FUNCIONAIS GLANDULARES**

Distúrbios funcionais das glândulas endometriais são pouco diagnosticados e pesquisados na égua. Na ginecologia humana, estas alterações são bem conhecidas como causa de infertilidade (SCHOON *et al.*, 1999b). Os métodos de diagnóstico para a má diferenciação endometrial começam pelo exame histopatológico de rotina (hematoxilina-eosina) e são confirmados por métodos imuno-histopatológicos: filamentos intermediários (vimentina, desmina), laminina, receptores para estrogênio e progesterona e o marcador antígeno Ki-67. Os distúrbios funcionais podem ocorrer espontaneamente (SCHOON *et al.*, 1998) ou no curso de neoplasias ovarianas hormonalmente ativas (BARTMANN *et al.*, 1998).

### **2.5.4.1 Má diferenciação glandular**

Existem dois tipos de má diferenciação glandular: desigual e irregular (SCHOON *et al.*, 1999b). Na diferenciação desigual, são definidas áreas que estão de acordo com a fase do ciclo ovariano e múltiplos focos não fibróticos de glândulas que se desviaram do padrão fisiológico dominante. Na diferenciação irregular, ocorre uma alteração glandular difusa que afeta todas ou quase todas as glândulas da amostra. Em alguns casos, está presente uma atividade proliferativa ou secretória alterada e em outros casos não se consegue enquadrar a amostra em nenhuma diferenciação fisiológica. Estas disfunções têm uma incidência de 7% na rotina diagnóstica (SCHOON *et al.*, 1999b). Distúrbios na diferenciação glandular podem levar à subfertilidade temporária ou permanente, provavelmente pela alteração que ocorre no ambiente uterino, que pode ser causada por distúrbios no padrão de produção de proteínas nas secreções uterinas, como ocorre na endometrose (BADER *et al.*, 1997).



#### **2.5.4.2 Diferenciação ciclo-assincrônica**

É comum que as glândulas dentro dos ninhos de fibrose apresentem uma “diferenciação ciclo-assincrônica”, isto é, o epitélio dessas glândulas não se diferencia histologicamente como o epitélio das glândulas sadias, não correspondendo à mesma fase do ciclo. Estas glândulas dentro dos ninhos passam a ter atividade secretória diferente, modificando o ambiente uterino e podendo ser a causa das alterações de fertilidade (SCHOON *et al.*, 1995). Foi encontrada, também, uma alta correlação entre o grau de endometrose e o aparecimento de glândulas ciclo-assincrônicas.

#### **2.5.4.3 Assincronia fisiológica**

Durante a transição do útero do período de inatividade fisiológica do anestro para a total funcionalidade pode ocorrer uma assincronia entre a diferenciação do endométrio e a elevada produção de hormônios pelo ovário (GROSS e LEBLANC, 1984). O endométrio apresenta glândulas ainda inativas às vezes concomitantemente a um epitélio luminal já ativo (KENNEY e DOIG, 1986).

#### **2.5.4.4 Atrofia**

A atrofia do endométrio ocorre fisiologicamente durante o anestro (KENNEY 1978; GROSS e LEBLANC, 1984). A atrofia durante a temporada de monta pode ser causada por uma disfunção ovariana ou por um endométrio refratário, com diminuição da resposta hormonal (SCHOON *et al.*, 1997). Apesar de a égua apresentar sinais externos de cio, o endométrio reage muito pouco ao estímulo estrogênico (KENNEY, 1978). Segundo Ricketts (1975), a atrofia endometrial ocorre freqüentemente em combinação com uma endometrite degenerativa crônica. A atrofia pode ocorrer também por senilidade ou inatividade ovariana em éguas debilitadas (KENNEY, 1978). As características histomorfológicas da atrofia são: epitélio luminal baixo a cúbico, poucas glândulas de pequeno

tamanho, com pequeno lúmen, epitélio glandular baixo com pequeno núcleo (SCHOON *et al.*, 1992).

#### **2.5.4.5 Hiperplasia glandular**

Caracteriza-se por um aumento no número de células das glândulas, bem como no seu comprimento ou tortuosidade (KENNEY, 1978). Segundo Ricketts (1975), a hiperplasia seria consequência da involução uterina, podendo estar relacionada com um aborto ou reabsorção embrionária. Ricketts e Barrelet (1997) observaram uma incidência de 4% de hiperplasia endometrial e uma ocorrência maior no pós-parto de éguas jovens como consequência de distúrbios na involução uterina.

#### **2.5.4.6 Hipoplasia glandular**

Uma hipoplasia endometrial ocorre em éguas jovens e em éguas com inatividade congênita dos órgãos reprodutivos (RICKETTS, 1975).

## **2.6 ENDOMETRITE E TRATAMENTOS**

A terapia da endometrite deve iniciar com a eliminação dos fatores predisponentes, como a correção de pneumovagina através de vulvoplastia e a prevenção da contaminação bacteriana durante a cobertura ou inseminação. O embrião só chega ao lúmen uterino no 5º ou 6º dia após a fertilização, e durante este período, o corpo lúteo é refratário à prostaglandina liberada pelo endométrio. Estas características permitem a realização de tratamentos intra-uterinos desde uma hora após a cobertura até o terceiro ou quarto dia após a ovulação (ASBURY, 1987). Tratamentos pós-cobertura devem ser realizados em relação ao momento da cobertura, mais do que em função do momento da ovulação (MATTOS *et al.*, 2003).

A lavagem uterina é empregada como forma de promover uma limpeza física do endométrio, facilitando a ação de drogas a serem infundidas posteriormente, como antibióticos, que não agem satisfatoriamente em presença de pus ou tecidos necróticos (SILVA, 1989). Segundo Asbury e Lyle (1993), com a lavagem uterina ocorre também uma estimulação do endométrio, com um aumento subsequente da migração de neutrófilos para o lúmen uterino. Vários estudos demonstram os benefícios da lavagem uterina com solução salina, associada a outros tratamentos ou não (TROEDSSON *et al.*, 1995; MATTOS *et al.*, 1997; MATTOS *et al.*, 1999a; MATTOS *et al.*, 1999b; MALSCHITZKY *et al.*, 2002).

A endometrite bacteriana é a causa mais comum de infertilidade na égua (SILVA, 1989). Os antibióticos tem sido amplamente utilizados para eliminar a infecção bacteriana do endométrio (LEBLANC *et al.*, 1989; ALLEN, 1991; HEARN *et al.*, 1993; ZENT, 1993; TROEDSSON *et al.*, 1995; PASCOE, 1995). Porém, o surgimento das penicilinas e sulfonamidas e o uso disseminado dos antibióticos após a II Guerra Mundial, não melhorou os índices de fertilidade da égua o longo dos anos (COLLINS, 1964). Além disso, o uso excessivo e repetido de antibióticos no útero tem sido associado ao desenvolvimento de endometrites fúngicas (BLUE, 1983; PUGH *et al.*, 1986; FREEMAN *et al.*, 1986). O uso de diluentes de sêmen contendo antimicrobianos foi recomendado por Burns *et al.* (1975), como forma de reduzir a contaminação bacteriana do útero.

A aplicação de ocitocina visa promover a limpeza física do endométrio pela contração miometrial. Em experimentos usando cintilografia, LeBlanc *et al.* (1994) observaram que éguas susceptíveis eliminaram o radiocolóide com eficiência semelhante às éguas resistentes, após a administração de 20 UI de ocitocina entre o 3º dia de cio e 48 horas pós-ovulação. Mattos *et al.* (1999c) observaram melhora na taxa de prenhez de éguas com potro ao pé tratadas apenas com ocitocina ou com ocitocina mais infusão de plasma com leucócitos. Porém, em estudo realizado com éguas susceptíveis (MATTOS *et al.*, 1999b), infectadas experimentalmente, foi observado que o uso isolado de ocitocina não promoveu a limpeza uterina em menos de 96 horas. O uso de ocitocina associada a lavagens uterinas promoveu o mesmo tempo de eliminação bacteriana (2,7 dias) que a lavagem combinada com plasma autólogo com leucócitos. Rasch *et al.* (1996) observaram que éguas que acumulam líquido no útero tratadas com ocitocina 7 a 8 horas

após a ovulação apresentaram melhores taxas de prenhez que aquelas sem tratamento. Mattos *et al.* (2003) sugerem o uso de ocitocina entre 4 a 6 horas após a inseminação, principalmente em éguas susceptíveis.

A infusão intrauterina de plasma homólogo tem sido utilizada para tratamento de endometrite na égua (ASBURY, 1984; WAELCHLI *et al.*, 1987; ASBURY e LYLE, 1993). Acredita-se que as opsoninas do plasma incrementem a fagocitose das bactérias pelos neutrófilos no útero. Foi preconizada por Castilho (1994) a utilização de infusão de plasma homólogo acrescido de neutrófilos. Após infecção experimental com *Streptococcus zooepidemicus*, Mattos *et al.* (1999a) observaram que as éguas que receberam este tratamento eliminaram a bactéria mais rapidamente que as tratadas com plasma homólogo ou com lavagens uterinas. Em um estudo comparando diferentes tratamentos pós-cobertura em 394 éguas, Mattos *et al.* (1997) observaram que o plasma homólogo acrescido de leucócitos melhorou a taxa de prenhez das éguas vazias do ano anterior. Mattos *et al.* (1999b) observaram que a lavagem uterina, combinada com posterior infusão de plasma com leucócitos, foi efetiva na eliminação das bactérias após infecção experimental, quando comparada à utilização de drogas ecbólicas.

### 3 ARTIGOS

#### 3.1 ARTIGO 1

**Acta Scientia Veterinariae v.32 p.215-223, 2004.**

**Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais  
repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios**

*Histopathological examination of mare's endometrium after repetitive experimental  
infections and five different treatments: inflammatory aspects*

Andrea Keller<sup>1</sup>, Adriana Pires Neves<sup>1</sup>, Heike Aupperle<sup>2</sup>, Katja Steiger<sup>2</sup>, Heinz-Adolph  
Schoon<sup>2</sup>, Erich Klug<sup>3</sup>, Ricardo Macedo Gregory<sup>1</sup> & Rodrigo Costa Mattos<sup>1</sup>

#### RESUMO

A endometrite é uma importante causa de subfertilidade na égua. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes tratamentos sobre o endométrio de éguas infectadas experimentalmente. Foram utilizadas vinte éguas resistentes, com histórico reprodutivo desconhecido, e cinco éguas susceptíveis, com histórico de endometrites recorrentes e subfertilidade. Após o primeiro exame histopatológico os ciclos foram sincronizados com prostaglandina. Na fase estral, as éguas foram infectadas com  $1 \times 10^9$  *Streptococcus equi*. Vinte e quatro horas após a infecção, os animais eram submetidos aos exames clínico, bacteriológico e citológico. Constatada a presença de sinais clínicos de endometrite, os grupos de éguas foram distribuídos entre cinco diferentes tratamentos: leucócitos frescos, leucócitos congelados, leucócitos lisados, Interleucina-8 e grupo

---

<sup>1</sup> - Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre

<sup>2</sup> Instituto de Patologia, Faculdade de Veterinária, Universidade de Leipzig

<sup>3</sup> Clínica para Equinos, Escola Superior de Veterinária de Hannover

Correspondência: R.C. Mattos Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, Brasil, #55 51 33195300,  
rcmattos@ufrgs.br

controle. As éguas foram tratadas diariamente, por no máximo, quatro dias, ou até que o exame bacteriológico não evidenciasse o crescimento de *Streptococcus*. No quinto dia, as éguas eram então submetidas a novo exame histopatológico e, no sétimo, dia todas as éguas eram tratadas com penicilina, independentemente de terem eliminado a infecção ou não. Sete dias após, as éguas eram novamente submetidas a exame histopatológico e sincronizadas para realizar uma nova infecção e novo tratamento. As biópsias foram avaliadas quanto à endometrite. Conclui-se que éguas susceptíveis à endometrite, com presença de *Streptococcus* no útero, não apresentam neutrofilia após cinco dias de infecção. Provavelmente o menor tempo de eliminação bacteriana observado nos tratamentos com leucócitos frescos e congelados deva-se a outros fatores que não o efeito quimioatraente dessas células.

Descritores: égua, endometrite, plasma, leucócitos, biópsia endometrial

#### ABSTRACT

Endometritis is an important cause of subfertility in the mare. The aim of this study was to determine the effect of different treatments on the endometrium of mares experimentally infected. Twenty resistant mares, with unknown reproductive history, and five susceptible mares, with history of recurrent endometritis and subfertility, were used. Cycles were synchronized with prostaglandin after the first histopathological examination. During estrus, mares were infected with  $1 \times 10^9$  *Streptococcus equi*. Twenty four hours after the inoculation, clinical, bacteriological and cytological examinations were performed. When endometritis clinical signs were detected, the groups of mares were distributed into five different treatments: fresh leukocytes, frozen leucocytes, lysed leucocytes, Interleukin-8 and control group. Mares were treated on a daily basis for no more than four days, or until there was no *Streptococcus* growth in bacteriological examination. On the fifth day, mares were submitted to a new histopathological examination and, on the seventh day, all the mares were treated with penicilin, independently of having eliminated infection, or not. Seven days after, mares were submitted to a new histopathological examination and synchronized in order to proceed to

a new infection and a new treatment. Biopsies were evaluated for endometritis. It was concluded that susceptible mares showing *Streptococcus* in uterus do not present with neutrophile growth five days after infection. The shorter time required for bacterial elimination when fresh and frozen leukocytes were used is probably due to other factors than leukocyte chemoattractive effect.

Key words: mare, endometritis, plasma, leukocytes, endometrial biopsy

## INTRODUÇÃO

A endometrite é uma importante causa de subfertilidade na égua. É bem documentada a infecção bacteriana transitória que ocorre durante a cobertura ou inseminação, mesmo que todas as medidas de higiene tenham sido tomadas. O quadro é passageiro em éguas sadias, denominadas resistentes, que são capazes de eliminar agentes bacterianos e produtos inflamatórios do lúmen uterino em poucas horas ou dias (WATSON, 1988). As éguas que falham em resolver esta endometrite aguda e permanecem continuamente infectadas são denominadas susceptíveis (FARRELY e MULLANEY, 1964; HUGHES e LOY, 1975; KENNEY, 1975).

Estas éguas demonstram atividade miometrial diminuída (TROEDSSON *et al.*, 1993b), permitindo a aderência das bactérias ao endométrio pela demora na limpeza de subprodutos da inflamação (LEBLANC *et al.*, 1994). Estudos feitos em câmaras quimiotáticas constataram que neutrófilos polimorfonucleares das secreções uterinas de éguas susceptíveis têm menor capacidade de migrar e fagocitar bactérias, quando comparados os de éguas resistentes (LIU *et al.*, 1985; WATSON *et al.*, 1987). Esta fagocitose deficiente seria resultado da influência negativa das secreções uterinas de éguas susceptíveis, que seriam mais pobres em opsoninas que as secreções uterinas das éguas resistentes (TROEDSSON *et al.*, 1993c).

A biópsia endometrial é um procedimento confiável e seguro para o diagnóstico e prognóstico de distúrbios endometriais relacionados à infertilidade na égua (SCHOON *et al.*, 1997). A técnica é útil para detectar alterações associadas com baixa fertilidade, não facilmente diagnosticadas por outros métodos, e para monitoração da resposta a uma terapia uterina específica (DOIG e WAELCHLI, 1993).

O objetivo deste trabalho foi documentar o efeito de diferentes tratamentos sobre o endométrio, após infecções experimentais, através do exame histopatológico do material obtido por biópsia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas vinte éguas resistentes e cinco éguas susceptíveis, mantidas a campo num sistema extensivo de exploração. As 20 éguas, com histórico reprodutivo desconhecido, foram classificadas como resistentes durante o experimento. As cinco éguas classificadas como susceptíveis tinham histórico de endometrites recorrentes e subfertilidade e já haviam sido utilizadas em outros experimentos com infecção experimental. As éguas foram divididas em cinco grupos de cinco éguas. Cada grupo contava com uma égua susceptível e quatro resistentes.

Foram utilizados 5 tratamentos diferentes, descritos a seguir.

*Leucócitos frescos*: colhiam-se cerca de 300mL de sangue da jugular da égua a ser tratada, em tubo heparinizado<sup>1</sup>. Em seguida eram adicionados 120mL de solução de dextrose<sup>2</sup> a 6%, deixando-se decantar durante cerca de trinta minutos. O sobrenadante era, então, infundido no útero, em um volume de 120mL (Mattos *et al.*, 1999 a; Mattos *et al.*, 1999b).

*Leucócitos congelados*: os leucócitos foram separados e congelados em macrotubos [3]. Em cada macrotubo eram envasados 4 mL de leucócitos ( $2 \times 10^8$  leucócitos/mL) diluídos em plasma heterólogo e 5% de DMSO. As amostras tinham, em média, 95% de vitalidade, medida por citometria de fluxo. As amostras eram descongeladas a 37 °C e o conteúdo de um macrotubo diluído em 120 mL de solução salina antes de ser infundido no útero.

*Leucócitos lisados*: sua preparação ocorreu da mesma forma que os leucócitos criopreservados, porém, ao ser feita a contagem e diluição das células, estas eram congeladas em um freezer a -100°C sem crioprotetor, durante 24 horas, para provocar a lise das células. As amostras eram então descongeladas a 37°C, envasadas em macrotubos e congeladas em nitrogênio líquido.

---



*IL-8*<sup>2</sup> uma solução de interleucina foi diluída em PBS a uma concentração de 25ng/mL, envasada em macrotubos e congelada em nitrogênio líquido, sem necessidade de curva de resfriamento específica.

*Controle*: consistia de solução de R3F (meio RPMI-1640<sup>3</sup> com 3% de soro fetal bovino) envasada em macrotubos e congelada em nitrogênio líquido.

*Bactéria*: foi utilizada uma cepa de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, originária de um animal tratado na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após o isolamento, a bactéria foi repicada, cultivada por 24 horas e então acondicionada em palhetas plásticas de 0,5 mL e congelada em nitrogênio líquido até o momento da infecção experimental. Para a realização do experimento, uma das palhetas era descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Seu conteúdo era semeado em ágar-sangue e incubado a 37°C por 24 horas. As placas eram lavadas com solução PBS e o lavado era então filtrado e ressuspenso em PBS até uma concentração final de  $1 \times 10^9$  bact/mL. A solução era mantida refrigerada até sua utilização.

*Delineamento experimental*: Foi feito um delineamento do tipo Quadrado Latino, com uma repetição, dividido em duas etapas: infecções experimentais e tratamentos. As 25 éguas foram submetidas a exame histopatológico (amostra pré-infecção) e sincronizadas com prostaglandina. No primeiro estro, com a presença de folículo dominante, as éguas foram infectadas experimentalmente com  $1 \times 10^9$  *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, em uma suspensão de 20mL. Só foram infectadas éguas que não apresentavam sinais clínicos de endometrite. Constatada a presença de sinais clínicos de endometrite, os grupos de éguas foram distribuídos entre os cinco diferentes tratamentos:

T1 – Leucócitos frescos - Infusão de 120 mL de plasma homólogo acrescido de leucócitos frescos.

T2 – Leucócitos congelados – Infusão de  $800 \times 10^6$  leucócitos criopreservados em macrotubos, íntegros, descongelados e diluídos em 120mL de solução salina.

T3 – Leucócitos lisados - Infusão de  $800 \times 10^6$  leucócitos criopreservados em macrotubos, lisados, descongelados e diluídos em 120mL de solução salina.

T4 – IL-8 - Infusão de 100 ng de Interleucina-8 criopreservada em macrotubos, descongelada e diluída em 120mL de solução salina.

T5 – Controle - Infusão de meio R3F criopreservado em macrotubos, descongelado e

diluído em 120mL de solução salina.

Os tratamentos T2, T3, T4 e T5 foram identificados por diferentes cores (azul, vermelho, verde e preto) e armazenados em botijão de nitrogênio líquido. O executor não teve conhecimento, durante o desenrolar do experimento, da identificação dos diferentes tratamentos.

Os grupos de éguas eram diariamente examinados clinicamente e submetidos a exames bacteriológico (MERKT e VON LEPPPEL, 1970) e citológico (MATTOS *et al.*, 1984). Os tratamentos foram repetidos diariamente por, no máximo, 4 dias, ou até a obtenção de um exame bacteriológico negativo. As éguas foram tratadas diariamente, por, no máximo, quatro dias, ou até que o exame bacteriológico não evidenciasse o crescimento de *Streptococcus*. No quinto dia após o aparecimento dos sinais clínicos, as éguas eram submetidas a novo exame histopatológico (amostra pós-infecção) e, no sétimo dia, todas as éguas eram tratadas com uma infusão intra-uterina de penicilina G potássica cristalina, independente de terem eliminado a infecção ou não. Sete dias após, as éguas eram novamente submetidas a exame histopatológico e sincronizadas para realizar uma nova infecção e novo tratamento. Todas as éguas foram submetidas a todos os tratamentos, perfazendo um total de 125 infecções experimentais. A figura 1 mostra um esquema explicativo com as etapas do experimento.

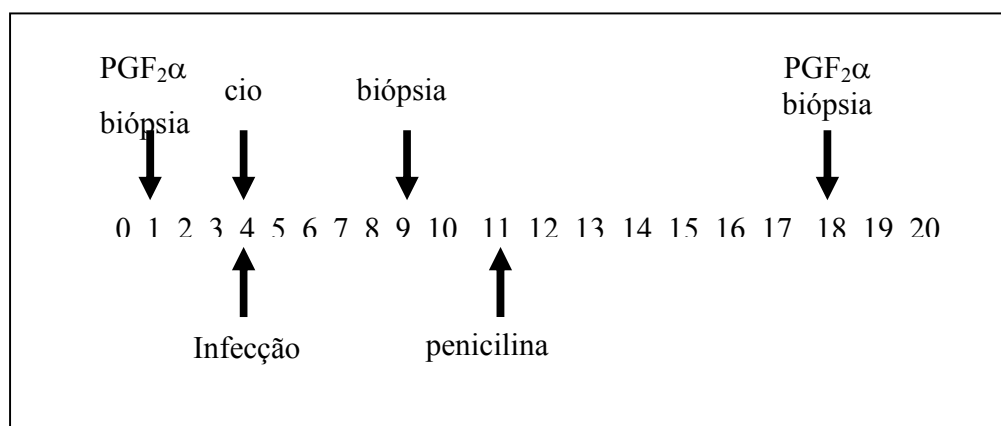


Figura 1. Esquema explicativo das etapas do experimento

As biópsias uterinas foram coletadas com pinça tipo Yeoman e as amostras conservadas em formalina a 10%. As biópsias foram embebidas em parafina após o procedimento padrão no Hypercenter XP<sup>4</sup>, seccionadas com micrótomo<sup>5</sup> a 3-4 µm e coradas com hematoxilina – eosina. As amostras foram examinadas por microscopia óptica em aumento de 100, 200 e 400 vezes.

Um total de 250 biópsias (10 biópsias por égua) foram avaliadas quanto ao efeito do tratamento para infecção experimental (biópsia pré e pós-infecção), com um total de 5 repetições.

As biópsias foram coletadas durante um período de 13 meses (fevereiro de 2001 a março de 2002), sendo que, no primeiro ano, foram avaliados os tratamentos da primeira e segunda infecções. No segundo ano foram avaliados os tratamentos da terceira, quarta e quinta infecções.

As amostras eram identificadas por números, não sendo conhecidos, durante sua avaliação, o nome da égua e o tratamento recebido.

Nas biópsias endometriais foram avaliados: 1) o epitélio luminal, quanto ao número de camadas, formato das células e presença de células inflamatórias; 2) os estratos compacto e esponjoso, quanto à presença de células inflamatórias; 3) os vasos, quanto à perivasculite. Nesta avaliação não foi levado em conta o grau de endometrose das éguas.

A classificação do grau de endometrite foi feita segundo Kenney e Doig (1986), modificado por Schoon *et al.* (1992). Os graus de endometrite foram numerados de 0 a 3, conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** – Classificação do grau de endometrite segundo Kenney e Doig (1986), modificado por Schoon *et al.* (1992)

GRAUS	Classificação da endometrite
0 – I	Sem inflamação
1 - IIA	LEVE a MODERADA infiltração inflamatória difusa no estrato compacto; focos numerosos disseminados no estrato compacto e esponjoso
2 - IIB	MODERADA difusa ou GRAVE focal infiltração inflamatória
3 - III	GRAVE e difusa infiltração inflamatória.

A endometrite foi avaliada quanto à presença de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos. O grau de endometrite foi determinado pelo número de células por campo (5mm) no estrato compacto e no estrato esponjoso. Como grau 1, foi classificado o endométrio com 0 a 15 células/campo; como grau 2, o endométrio com 15 a 30 células/campo; como grau 3, o endométrio com > 30 células/campo. Foram considerados graus intermediários (1,5 a 3,5) aqueles em que a endometrite abrangia o estrato esponjoso (0,5 grau a mais).

Para verificação da influência dos tratamentos, foi criado um *index* com o objetivo de verificar se os neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos e linfócitos variaram entre as biópsias efetuadas antes e após a infecção. Para tanto, determinou-se que o grau de inflamação provocada por cada tipo de célula fosse considerado 100 na biópsia pré-infecção. O *index* aumentava ou diminuía na razão de 10 pontos quando ocorria aumento ou diminuição de um nível no grau de endometrite para cada tipo de célula. Nos casos de aumento ou diminuição de meio grau, considerava-se uma variação de 5 pontos para mais ou para menos no *index*.

Para a análise das médias dos tempos até a cura bacteriológica foi usado o procedimento GLM (Modelos Lineares Generalizados), do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 6.12, considerando-se os efeitos das éguas, da categoria, seqüências dos grupos experimentais, do Quadrado Latino e dos tratamentos e suas interações. As comparações entre as médias dos tratamentos foram feitas pelo teste LSMeans (Least Square Means). Para a análise do *index* foi utilizada a análise de variância (procedimento GLM do SAS), em um modelo factorial com delineamento em blocos casualizados. As éguas foram consideradas como blocos. A variável resposta foi o *index*. Como fatores, foram testados os tratamentos, as células, a resistência e susceptibilidade.

## RESULTADOS

As éguas susceptíveis e resistentes foram classificadas inicialmente, antes do experimento, quanto ao grau de alterações degenerativas e inflamatórias endometriais,

segundo Kenney e Doig (1986), modificado por Schoon *et al.* (1992). A classificação endometrial das éguas está expressa na tabela 2.

Tabela 2. Classificação histopatológica do endométrio das éguas susceptíveis e resistentes, segundo Kenney e Doig (1986), modificado por Schoon *et al.*(1992), conforme os graus de endometrite e endometrose

Grau	Susceptíveis	Resistentes
I	4	-
IIa	10	-
IIb	6	2
III	-	3

A maioria das éguas resistentes apresentou endométrio sem alteração (n=4) ou com alterações leves (n=10). As alterações moderadas foram observadas em 6 éguas resistentes. As éguas susceptíveis apresentaram apenas alterações moderadas (n=2) e graves (n=3).

A tabela 3 mostra o tempo (em dias) necessários para que as éguas susceptíveis e resistentes eliminassem a bactéria após a infecção experimental com *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Tabela 3. Número de dias de tratamento necessário para a eliminação da bactéria após infecção experimental nos diferentes grupos em éguas resistentes

Tratamento	Resistentes (dias)	Susceptíveis (dias)
Leucócitos frescos	2,0±0,97 <sup>a</sup>	2,6±0,89 <sup>a</sup>
Leucócitos congelados	1,95±1,23 <sup>a</sup>	3,4±1,14 <sup>ab</sup>
Interleucina-8	2,55±1,61 <sup>a</sup>	6,0±1,58 <sup>c</sup>
Leucócitos lisados	2,85±1,47 <sup>a</sup>	4,4±0,89 <sup>b</sup>
Controle	2,7±1,41 <sup>a</sup>	6,2±2,05 <sup>c</sup>

a (p= 0,1219) não houve diferença significativa

a,b,c (p= 0,0001) letras diferentes indicam diferença significativa

Observa-se, na tabela 3, que, nas éguas resistentes, não houve diferença significativa no número de dias para eliminação da bactéria entre os diferentes tratamentos. As éguas susceptíveis tratadas com interleucina-8 e o grupo controle levaram mais tempo para eliminar a bactéria quando comparados aos demais tratamentos e não diferiram entre si ( $p=0,8084$ ). Os tratamentos leucócitos frescos e leucócitos congelados não apresentaram diferença significativa no tempo de eliminação da bactéria ( $p=0,3334$ ). O tratamento leucócitos lisados diferiu significativamente de todos os demais tratamentos ( $p<0,05$ ), exceto dos leucócitos congelados ( $p=0,2274$ ).

Na Figura 2 estão expressos os resultados obtidos nas biópsias pós-infecção, considerando-se a predominância das células encontradas e o tempo de eliminação bacteriana das éguas resistentes e susceptíveis

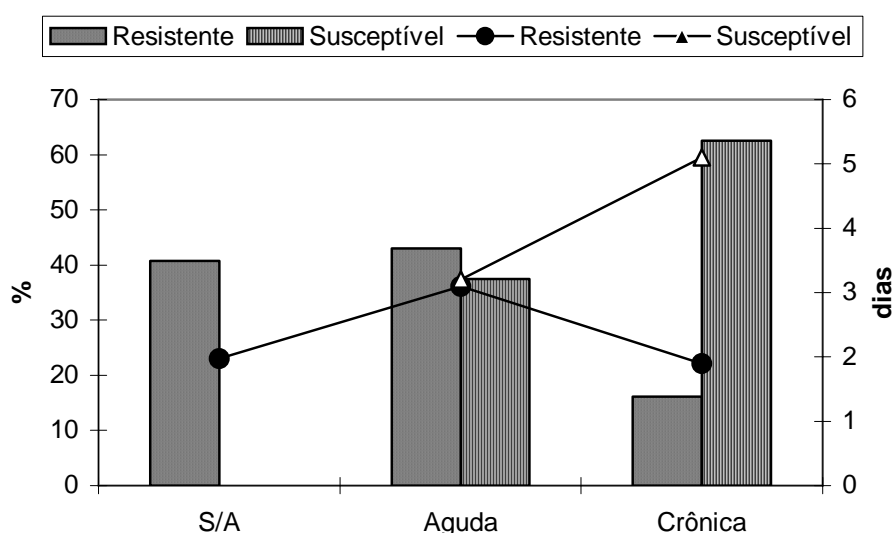


Figura 2. Tipo de endometrite (%) observada na biópsia pós-infecção em éguas resistentes e susceptíveis, conforme a predominância das células encontradas e o tempo de eliminação bacteriana (●- resistentes, ▽-susceptíveis). S/A sem alteração. Agudas - biópsias com predominância de neutrófilos e eosinófilos; crônicas - biópsias com predominância de plasmócitos e linfócitos

Observa-se, na Figura 2, que mais de 40% das éguas resistentes não apresentaram alterações na biópsia e tiveram um tempo de eliminação bacteriana de 1,97 dia.

Entretanto, nenhuma égua susceptível apresentou-se sem alteração. Endometrites agudas foram observadas em 43% das éguas resistentes e 37% das éguas susceptíveis e os tempos de eliminação do *Streptococcus* foi de 3,1 e 3,2 dias respectivamente. As endometrites com predominância de plasmócitos e linfócitos foram observadas em 16,1% das éguas resistentes e 62,5% das susceptíveis com tempos de eliminação bacteriana de 1,9 e 5,1 dias.

O *index* do número médio de neutrófilos das biópsias endometriais coletadas no 5º dia pós-infecção das éguas resistentes e suscetíveis está expresso na Figura 3.

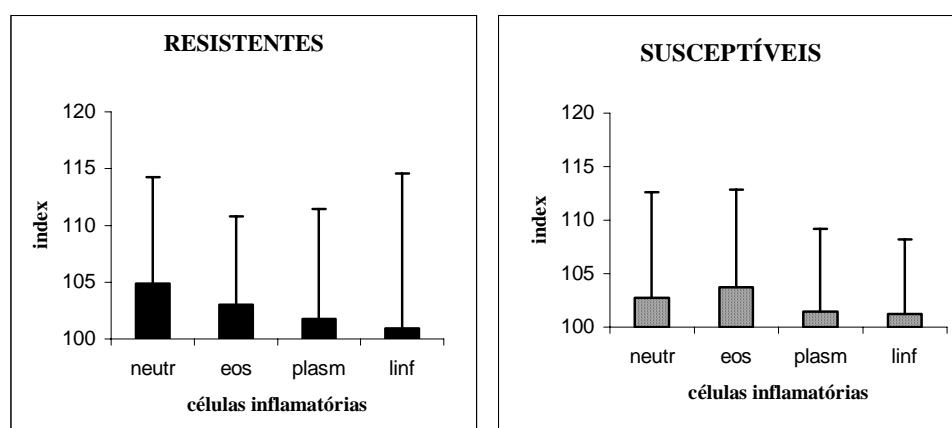


Figura 3. *Index* do número médio de neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos e linfócitos observados nas biópsias no 5º dia pós-infecção em éguas resistentes e susceptíveis

Observou-se (Figura 3), nas éguas resistentes, uma neutrofilia ( $p < 0,0001$ ) e uma eosinofilia ( $p = 0,0002$ ) significativas nas biópsias do 5º dia pós-infecção, quando comparadas com as biópsias pré-infecção. O número de plasmócitos ( $p = 0,0822$ ) e linfócitos ( $p = 0,04961$ ) das biópsias pós-infecção não apresentou diferença significativa em relação às biópsias pré-infecção. Entretanto, nas éguas susceptíveis observou-se apenas uma eosinofilia significativa ( $p = 0,0498$ ) nas biópsias pós-infecção, quando comparadas às biópsias pré-infecção, não havendo diferença entre neutrófilos ( $p = 0,6731$ ), plasmócitos ( $p = 0,3552$ ) e linfócitos ( $p = 0,3833$ ).

O *index* do número médio de neutrófilos das biópsias endometriais coletadas no 5º dia pós-infecção em éguas resistentes e susceptíveis, conforme os diferentes tratamentos, está expresso na Figura 4.

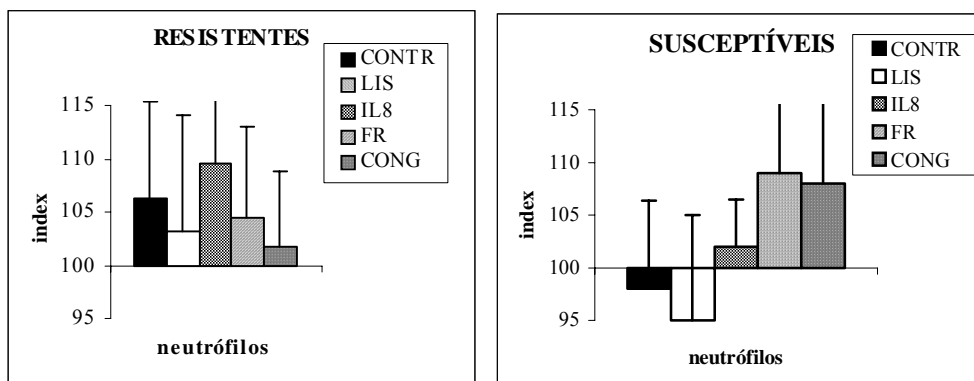


Figura 4. *Index* do número médio de neutrófilos das biópsias endometriais do 5º dia pós-infecção em éguas suscetíveis e resistentes após diferentes tratamentos

Na Figura 4, observa-se que o *index* do número de neutrófilos observado nas biópsias pós-infecção não se diferenciou significativamente entre os diferentes tratamentos nas éguas resistentes ( $p=0,0633$ ) e suscetíveis ( $p=0,1782$ ). Entretanto, observou-se uma variação individual significativa entre as éguas resistentes ( $p=0,0134$ ), o que não foi observado entre as éguas suscetíveis ( $p=0,6135$ ).

O efeito do número de dias de tratamento sobre o *index* do número médio de neutrófilos nas biópsias no 5º dia pós-infecção das éguas resistentes, está demonstrado na figura 5.

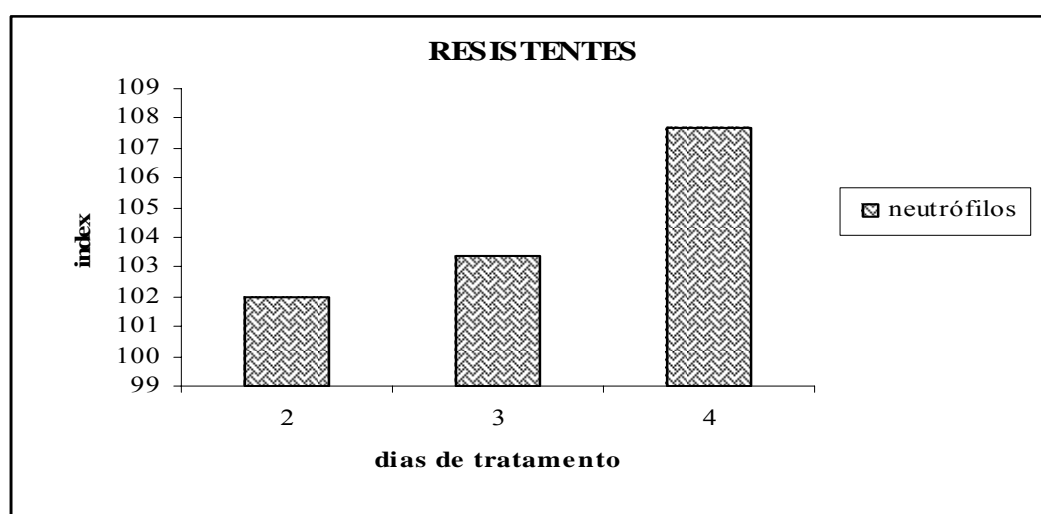




Figura 5. *Index* do número médio de neutrófilos com relação ao segundo, terceiro e quarto dia de tratamento, observado nas biópsias no 5º dia pós-infecção das éguas resistentes

Observa-se, na Figura 5, um aumento significativo ( $p=0,0103$ ) do *index* de neutrófilos das éguas resistentes em relação ao número de dias de tratamento, o que não ocorreu nas éguas susceptíveis. As éguas resistentes, após 2 dias de tratamento, apresentaram *index* 102,1, significativamente inferior ( $p=0,0020$ ) ao *index* 107,7 observado nas éguas tratadas por quatro dias.

O *index* do número médio de eosinófilos das biópsias endometriais coletadas no 5º dia pós infecção, em éguas resistentes e susceptíveis, está expresso na figura 6.

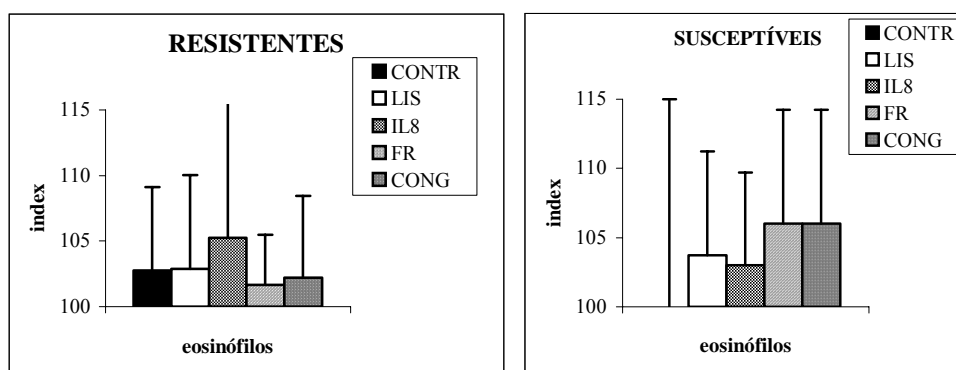


Figura 6. Média do número de eosinófilos das biópsias endometriais do 5º dia pós-infecção nas éguas susceptíveis e resistentes, nos diferentes tratamentos

Na Figura 6, observa-se que o *index* do número de eosinófilos observado nas biópsias pós-infecção não se diferenciou significativamente entre os diferentes tratamentos nas éguas resistentes ( $p=0,203$ ) e susceptíveis ( $p=0,5417$ ). Entretanto, observou-se uma variação individual significativa entre as éguas resistentes ( $p=0,0015$ ), o que não ocorreu entre as éguas susceptíveis ( $p=0,5568$ ).

Não se observou influência dos tratamentos no *index* de plasmócitos, tanto nas éguas resistentes ( $p=0,202$ ), como nas éguas susceptíveis ( $p=0,7851$ ). Da mesma forma, não foi observada influência dos tratamentos no *index* de linfócitos nas resistentes ( $p=0,1019$ ) e nas susceptíveis ( $p=0,7991$ ).

## DISCUSSÃO

Observou-se, nas éguas resistentes, neutrofilia e eosinofilia nas biópsias realizadas no 5º dia pós-infecção, quando comparadas às biópsias pré-infecção. Nas éguas susceptíveis foi detectada somente eosinofilia, não se observando aumento do número de neutrófilos. Não houve aumento no número de linfócitos e plasmócitos nas biópsias pós-infecção, em relação às pré-infecção, nas éguas susceptíveis e resistentes.

A neutrofilia das éguas resistentes foi dependente do número de dias de tratamento, mas não foi influenciada pelo tipo de tratamento. O número de dias de tratamento era dependente da presença da bactéria no útero. Provavelmente, a neutrofilia observada nas éguas resistentes está relacionada à presença do antígeno, já que a migração de neutrófilos da corrente circulatória para os tecidos extravasculares é um importante processo na inflamação e a defesa é mediada principalmente pelos polimorfonucleados (WATSON *et al.*, 1987). Entretanto, não foi observada neutrofilia nas éguas susceptíveis, mas observou-se que as éguas que eliminaram a bactéria mais rapidamente apresentaram um aumento do número de neutrófilos no quinto dia, o que não ocorreu nas éguas que permaneceram infectadas, nas quais predominaram os linfócitos e plasmócitos. Neutrófilos uterinos de éguas susceptíveis, coletados 12 horas após a inoculação da bactéria, não apresentam resposta quimiotática nem deformabilidade (LIU *et al.*, 1985). Da mesma forma, foi observada uma menor capacidade migratória e fagocítica em neutrófilos uterinos de éguas susceptíveis (Zerbe *et al.*, 2003). Parece que as éguas susceptíveis, que reagiram apresentando uma endometrite aguda mais forte, conseguiram fazer a limpeza uterina mais rapidamente. Talvez, a baixa capacidade migratória e fagocítica dos neutrófilos das éguas susceptíveis tenha permitido a permanência do processo inflamatório, levando, posteriormente, a uma refratariedade no recrutamento de novos neutrófilos.

Os tratamentos nas éguas resistentes e susceptíveis não influenciaram a migração de neutrófilos no quinto dia, quando comparado com o número observado antes da infecção. Todos os tratamentos utilizados, com exceção do grupo controle, apresentavam efeito quimioatraente. Nos tratamentos em que se utilizaram neutrófilos frescos e congelados, existia o efeito quimiotático dos próprios neutrófilos (FAURSCHOU e

BORREGAARD, 2003). No tratamento com leucócitos frescos, houve a presença do plasma homólogo Asbury (1984) na concentração de 60% (NEVES *et al.*, 2004), com forte efeito quimiotático. No tratamento com leucócitos lisados, infundiam-se no útero restos celulares apresentando, segundo experimentos realizados previamente com câmaras quimiotáticas (NEVES *et al.*, 2004), bom efeito de atração. No tratamento com interleucina-8 na concentração de 25ng/mL infundia-se um potente quimioatraente (ENGELKE *et al.*, 1999; ZERBE *et al.*, 2003).

Apesar de não se poder afirmar que não tenha ocorrido uma neutrofilia anterior ao quinto dia, provavelmente a eliminação bacteriana mais rápida apresentada pelas éguas susceptíveis tratadas com leucócitos frescos congelados e lisados não se deva aos fatores quimioatraentes infundidos.

É possível que a ausência de quimiotaxia observada no 5º dia pós-infecção pelas éguas tratadas com interleucina-8 se deva à dose utilizada. Bons resultados de quimiotaxia *in vitro* de leucócitos coletados do útero foram observados após uma infusão de uma dose total de 1250 ng de interleucina-8 em um volume de 50 mL de PBS (ZERBE *et al.*, 2003). No presente estudo, foi utilizada uma dose total de 100 ng de interleucina-8, diluída em 120 mL de NaCl. É possível que, com uma dose maior de interleucina-8, obtivéssemos resultados diferentes quanto à presença de neutrófilos no endométrio.

A eosinofilia teve variação individual significativa entre as éguas resistentes e susceptíveis, e não foi influenciada pelos dias de tratamento. Raramente foi observada uma endometrite apenas eosinofílica. Na maioria das vezes, os eosinófilos apareciam junto com os neutrófilos e, mais raramente, com linfócitos e plasmócitos. Blüthgen (2001) também observou um aumento no número de eosinófilos em éguas com endometrite purulenta e, quanto maior o grau da endometrite, maior o número de eosinófilos. Por outro lado, o autor não observou eosinófilos nas endometrites não purulentas moderadas e graves. O aparecimento de eosinófilos no endométrio da égua não está ainda totalmente esclarecido e parece estar relacionado com uma sensibilidade individual Schoon *et al.* (1997). Os eosinófilos são parte integrante do sistema de defesa da mucosa endometrial contra organismos invasores e produzem moléculas como prostaglandinas, leucotrienos e citoquinas, que amplificam a resposta inflamatória, recrutando e ativando mais eosinófilos, neutrófilos e células epiteliais (JANEWAY *et al.*,

1999). A presença de eosinófilos no útero sofre também influência hormonal. Durante o ciclo estral de éguas sadias, foram encontrados mais eosinófilos no endométrio durante a fase estrogênica (BLÜTHGEN, 2001). É possível que a eosinofilia encontrada no presente trabalho seja consequência da influência do estrogênio, já que as biópsias pós-infecção eram coletadas ainda durante o estro.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que éguas susceptíveis à endometrite, com presença de *Streptococcus* no útero, não apresentam neutrofilia cinco dias após a infecção. Provavelmente, o menor tempo de eliminação bacteriana observada após tratamento com leucócitos frescos e congelados deva-se a outros fatores que não a quimioatração exercida por essas células.

## NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup> Liquevine- Roche S.A.- São Paulo -SP

<sup>2</sup> Dextrosol- Refinações de Milho, Brasil – Itatiaia - RJ

<sup>3</sup> Human IL-8, Bio-Concept GmbH- Umkirch, Alemanha

<sup>4</sup> Biochrom – Berlin, Alemanha

<sup>5</sup> Shandon – Frankfurt, Alemanha

<sup>6</sup> Reichert-Jung, Austria

### 3.2 -ARTIGO 2

**Animal Reproduction v.2, n.3, p199-206, 2005**

**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. Neves<sup>1</sup>, A. Keller<sup>1</sup>, H. Zerbe<sup>2</sup>; W. Leibold<sup>3</sup>, E. Klug<sup>4</sup>, R. M. Gregory<sup>1</sup>, R.C.Mattos<sup>1a</sup>

*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*

---

<sup>a</sup> 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](mailto: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 Oxygen 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; b). 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 trans migrations

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 + NaHCO<sub>3</sub> 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  $200 \times 10^6$  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-Morlāw, 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% CO<sub>2</sub> for 2 hours.

#### *Measurement of leukocyte vitality*

After incubation, the content of each upper and lower corresponding well was stirred, 100 $\mu$ L of each mixture were transferred to the cytometry tubes (FACScan Tubes, Becton Dickinson Labware Europe, 38241 Meylan Cedex- France) and 200 $\mu$ L of propidium iodide (100 $\mu$ L/mL, Calbiochem Novabiochem GmbH, Litzweg 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% CO<sub>2</sub> 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 reincubation, 5 $\mu$ L 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 (0 $\mu$ L,

100 $\mu$ L). Two hundred microliters solutions containing 0%, 1%, 2% or 6% dextrose (Müller's Mühle Traubenzucker, MN GmbH, 45801 Gelsenkirchen, Germany) with or without 100 $\mu$ L 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  $\mu$ L of a solution with  $2 \times 10^6$  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 200 $\mu$ L 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 $\mu$ L rhIL-8 (25ng/mL), and Percoll as a diluent. All samples and controls were run in duplicates. Each upper well was filled with  $2 \times 10^6$  leukocytes diluted in 200  $\mu$ 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  $-100^{\circ}\text{C}$  without cryoprotectant. After 24 hours, samples were thawed at  $37^{\circ}\text{C}$  and resuspended in PBS, to the desired concentration.

To evaluate chemotaxis, lower wells were filled with 300  $\mu\text{L}$  of a PBS solution containing  $0.4 \times 10^6$ ,  $2.0 \times 10^6$  or  $10.0 \times 10^6$  lysed leukocytes. An additional well was filled with 300 $\mu\text{L}$  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  $1.2 \times 10^6$  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 macro tubes as described above. Samples from six different batches were randomly thawed at  $37^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$ , with 5%  $\text{CO}_2$ , 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  $10 \times 10^6$  lysed leukocytes were used, the leukocyte migration was similar ( $P=0.42$ ) to that of rhIL-8, and greater than those of  $2.0 \times 10^6$  ( $P<0.01$ ) and of  $0.4 \times 10^6$  ( $P<0.01$ ) lysed leukocytes. It was also observed that the concentration of  $2 \times 10^6$  lysed leukocytes caused a greater migration ( $P=0.04$ ) of cells than the concentration of  $0.4 \times 10^6$  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 $\mu$ L rhIL-8 was used, totalizing 7.5 $\mu$ g per well, while in Experiment 1, 100 $\mu$ L rhIL-8 per well were used, totalizing 2.5 $\mu$ 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; 1999c), 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, b), as well as the better pregnancy rates obtained (MATTOS *et al.*, 1997; MATTOS *et al.*, 1999c), 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  $2 \times 10^6$  lysed leukocytes were used, leukocyte attraction rate was similar to that of 30% homologous and heterologous plasma. Also,  $10 \times 10^6$  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 & 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.

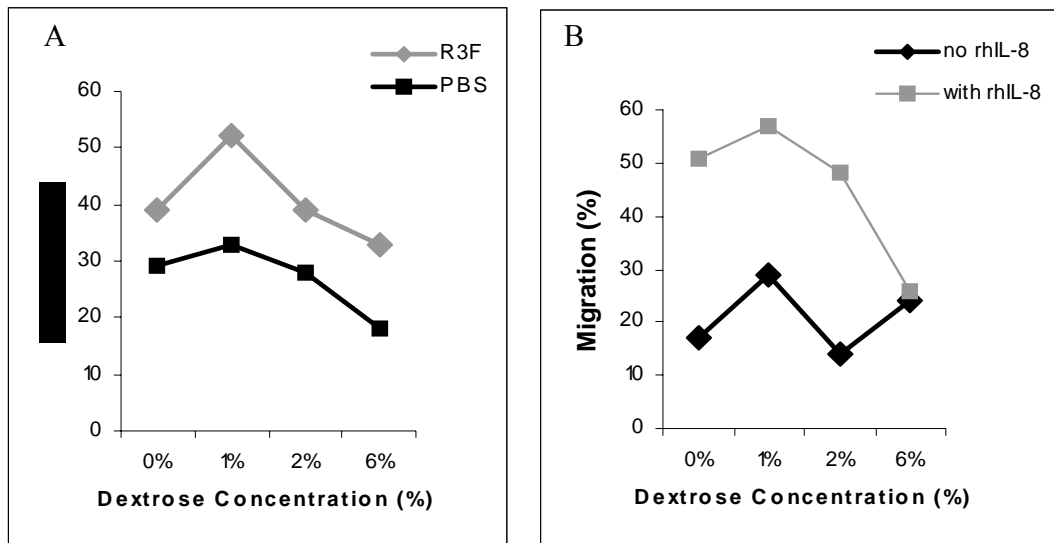


Figure 1. (A) Percent of leukocytes, diluted in PBS or R3F cell culture medium, migrating towards different dextrose concentrations ( $P < 0.01$ ).

(B) Percent of leukocytes, with or without rhIL-8, migrating towards different dextrose concentrations ( $P = 0.02$ ).

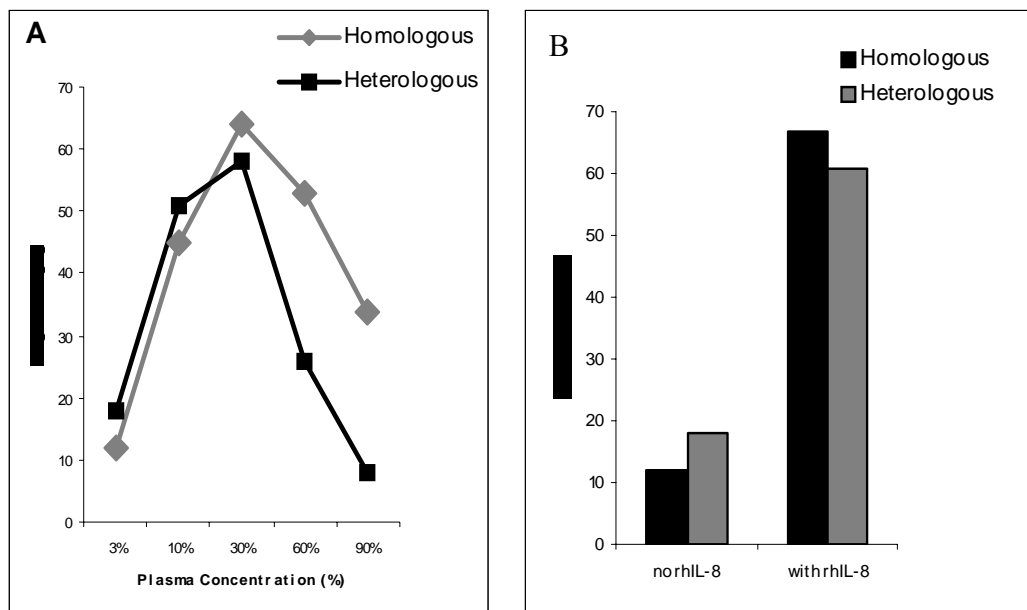
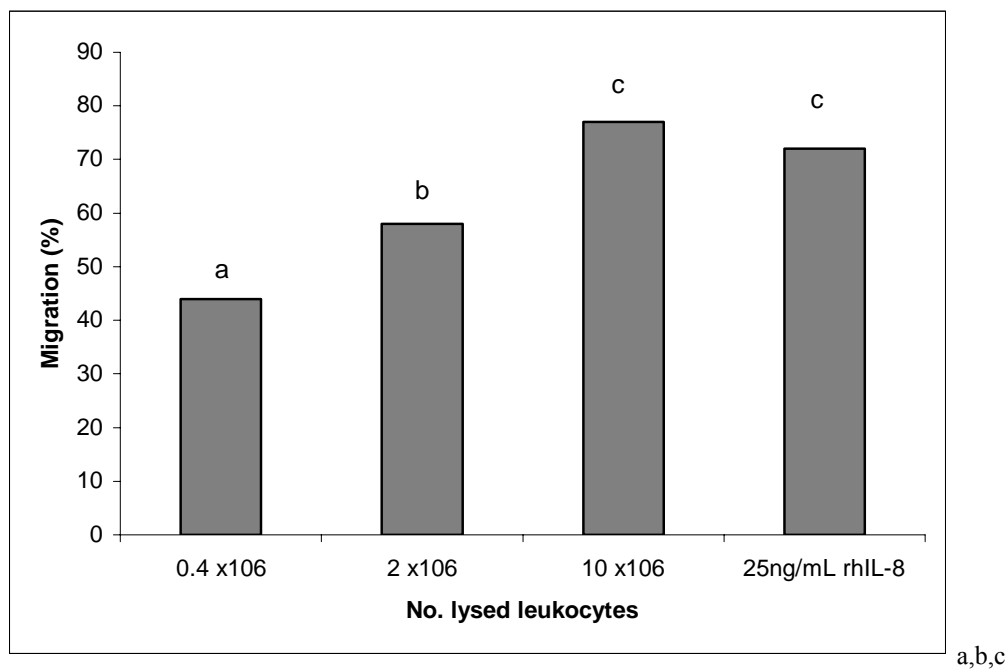


Figure 2. (A) Percent of leukocyte migration towards different concentrations (3%, 10%, 30%, 60% and 90%) of homologous and heterologous plasma ( $P < 0.39$ ).

Quadratic regression analysis expressed the following equation:  $\text{Migration} = 134483 + (88298.8 \text{ conc.}) - (2004.04 \text{ conc}^2) + (11.7682 \text{ conc}^3)$ .

(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.



( $P < 0.04$ ) different characters 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.

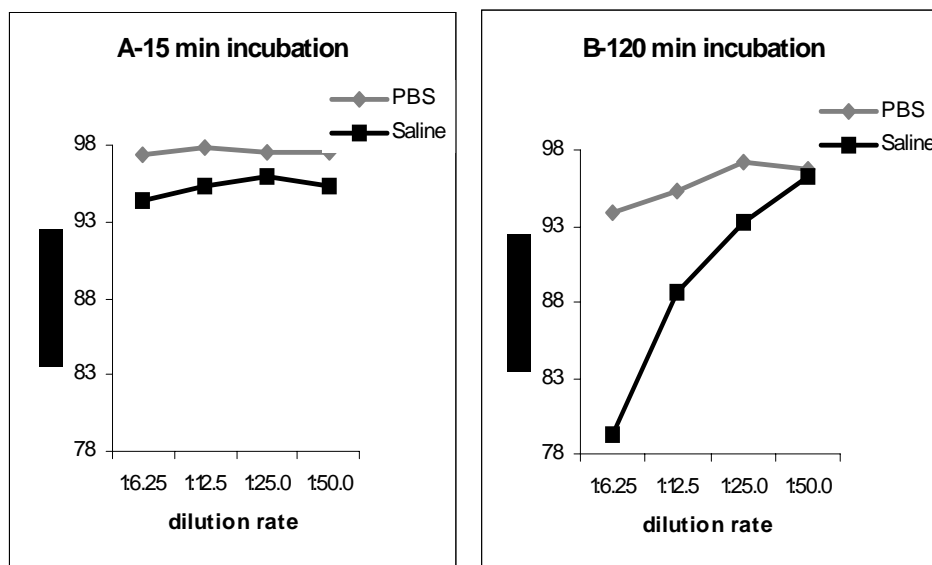
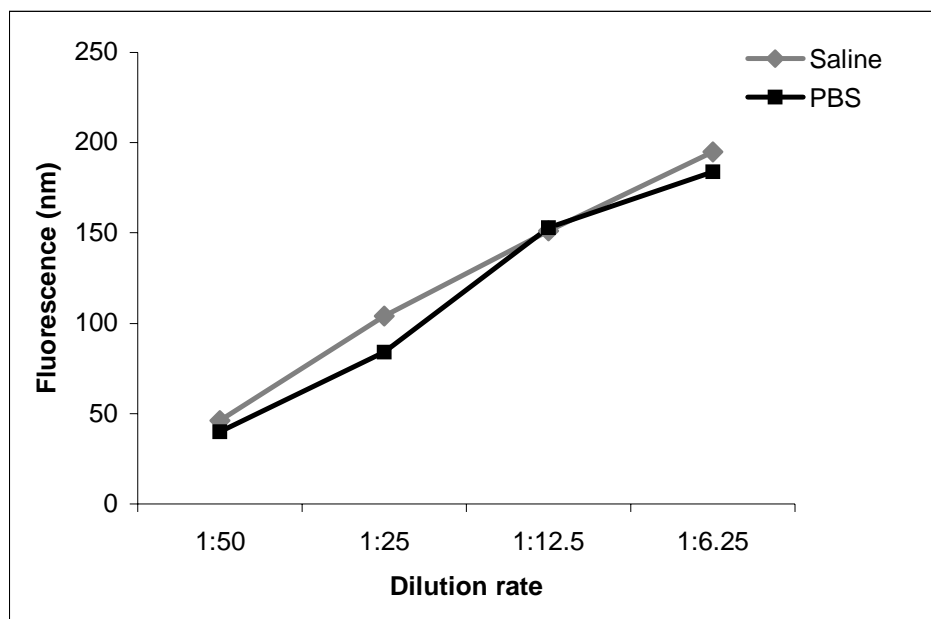


Figure 4. (A) Vitality of leukocytes thawed and re-suspended in PBS or in saline after 15-minute incubation.

(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  $P=0.79$ ).



Fig

re 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  $P<0.01$ ).

### 3.3- ARTIGO 3

**Animal Reproduction Science, v. 94, p.276-279, 2006.**

#### **Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare**

A. Keller<sup>1</sup>; A. P. Neves<sup>1</sup>; H. Aupperle<sup>2</sup>; K. Steiger<sup>2</sup>; P. Garbade,  
H-A Schoon<sup>2</sup>; E. Klug<sup>3</sup>; R.C. Mattos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Reprolab, Departamento Medicina Animal; UFRGS Brazil* <sup>2</sup>*Institiüt für Veterinär Pathologie, Universität Leipzig; Germany* <sup>3</sup>*Klinik für Pferde, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany*

#### **1. Introduction**

Endometrial fibrosis, a major cause of reduced reproductive efficiency in mares, is a progressive, irreversible condition that is correlated with age and aggravated by frequent endometrial challenges. Degenerative changes of the endometrium may result from repeated inflammation (TROEDSSON, 1997) or be a sequel from uterine infection or uterine therapy. Any injury that causes an inflammatory reaction may induce fibrosis. Once initiated, the replacement of tissue by fibroblasts and the accumulation of extra cellular matrix can continue despite cessation of injury (CADARIO *et al.*, 2002).

Angiosis in the equine endometrium is detected in varying quality and quantity in nearly 80% of broodmares. Older maiden mares show a mostly mild sclerosis within the *intima* and the *adventitia* (SCHOON & SCHOON, 2003). Decreased vessel elasticity in older mares with higher degree of fibrosis leads to chronic hypoxia, which probably affects fibrogenic cytokine production and release. (CADARIO *et al.*, 2002).

Diagnosis of endometrial fibrosis and angiosis is confirmed by endometrial biopsy. A single biopsy has been considered representative of the entire uterus; however, some studies have shown variation between different sites (DYBDAL *et al.*, 1999).

This study aimed to clarify if endometrial fibrosis and angiosis in the mare are influenced by successive experimental bacterial infections.

- 
- Corresponding author. E-mail: [rcmattos@ufrgs.br](mailto:rcmattos@ufrgs.br)



## 2. Materials and methods

Twenty mares (8 to 12 yr old) with unknown reproductive history were infected experimentally during five oestrous cycles. Before each experimental infection, the mares were examined for reproductive soundness including palpation per rectum and ultrasound of the genital tract, bacteriological cultures and cytology of the endometrium and an endometrial biopsy (pre-infection sample). Only clinically normal mares with negative cytology and bacterial cultures were used (n=20). When a dominant follicle (>35 mm) was detected in oestrus, the uterus was infused with  $1 \times 10^9$  *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* suspended in 20mL of PBS.

On the fifth day after the bacterial inoculation, an endometrial biopsy specimen was obtained (post-infection sample). On the seventh day, all mares received an intrauterine infusion of  $5 \times 10^6$  IU of penicillin G. A new endometrial biopsy (2<sup>nd</sup> pre-infection sample) was taken when the mares were again infected.

Endometrial biopsies were stained with hematoxylin-eosin and classified as described by Kenney & Doig (1986) and modified by Schoon *et al.* (1992), in a blind manner observing only the degenerative process. The distribution and the severity of inflammation were not considered in the categorization of biopsies. Endometriosis was classified in the following way: Grade I, no periglandular fibrosis or nests; Grade III, severe endometriosis presenting diffuse periglandular fibrosis with  $\geq 10$  layers, with >4 nests per field and many lymphatic lacunae; Grade IIA, slight endometriosis with diffuse periglandular fibrosis with 1 to 3 layers, <2 nests per field and few lymphatic lacunae; Grade IIB, diffuse periglandular fibrosis with 5 to 10 layers, 2 to 4 nests per field and an occasional presence of lymphatic lacunae.

Angioesclerosis was also classified but was not used as a classification criterion for the degree of endometriosis (Schoon *et al.*, 1992). The amount of collagen and elastic fibers in the *intima*, *media* and *adventicia* layers of arteries and veins of the endometrium were evaluated.

The time interval between the first pre-infection and the second post-infection biopsy was around 60 days and the time interval between the third pre-infection and the fifth post-infection biopsy around 90 days. Mares became anoestrous in winter between the second post-infection and the third pre-infection biopsy and the interval was approx. 180

days.

The data were analyzed using ANOVA and with a statistical significance accepted at  $P < 0.05$ . The endometriosis grades and the angiosclerosis classification were converted in numbers (1 – 4) and their logarithm was used as dependent variable. The effects of infections repetitions were tested against mares. Statistical analysis of the experiment was carried out using the General Linear Model procedure

### 3. Results

All 20 mares presented clinical signs of endometritis 24 hours after the experimental infection. Fig. 1 shows the results of the endometriosis grades during the five experimental infections.

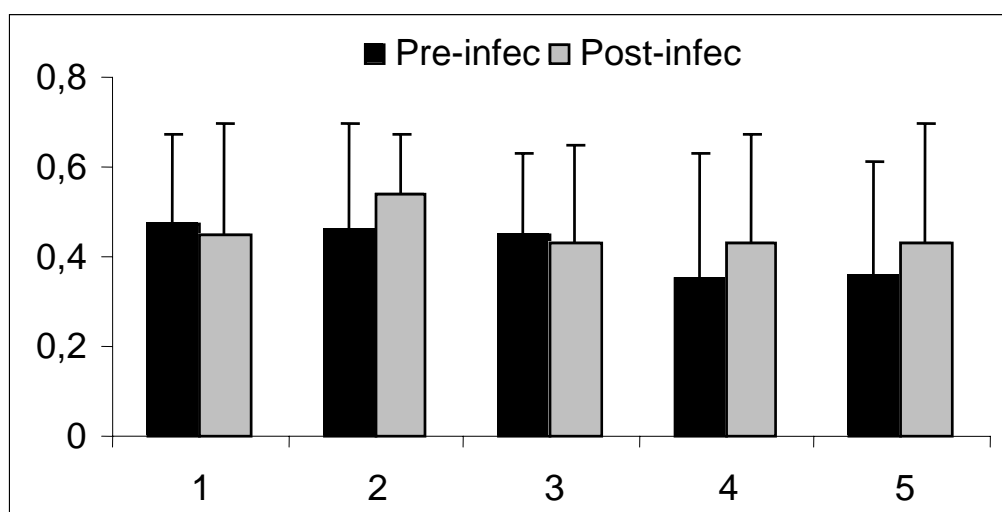


Figure 1. Mean grades of endometriosis transformed to  $\log_{10}$  in biopsies collected before and after the experimental infections.

There were no significant differences among the grades of endometriosis before the experimental infections and on the fifth day after the five infections ( $P = 0.2$ ). Equally, there was no differences in grades of endometriosis among the biopsies taken before the infections ( $P = 0.3$ ) as well as among post-infection biopsies collected on the fifth day ( $P = 0.3$ ).

There was a significant difference among mares concerning endometrosis degree in the biopsies taken before ( $P = 0.02$ ) and after the experimental infection ( $P = 0.006$ ). Only one mare kept the same grade during the experiment. Similarly, only three mares presented the same grade of endometrosis in 80% of the biopsies collected. While in 25% of the mares the same grade was maintained between the first and the last biopsies, in 35% of mares the grade was lowered and in 40% the grade was raised. On the other hand, in 9 mares there was a difference of 2 and in 10 mares a difference of 3 between the grades of endometrosis. A grade variation was observed among the pre- and post-infection biopsy specimen in 41% of the experimental infections.

No significant differences were observed between the degrees of angiosclerosis before the infections and on the fifth day after the last infection ( $P = 0.2$ ). Similarly, no difference in the grade of angiosclerosis between biopsies before infections were observed ( $P = 0.4$ ), as well as between biopsies collected at the fifth day after infection ( $P = 0.3$ )

#### **4. Discussion**

The successive bacterial infections and the subsequent uterine inflammatory reaction did not influence the grade of endometrosis. It was expected that the grades would stay the same or get worse by the successive uterine bacterial insults. However, great variation in the grades of endometrosis between the collections in the same mare was detected. Ten biopsies were collected from each mare and only one mare kept the same grade of endometrosis during the experiment., while ten mares showed variation of 3 degrees, sometimes even to a better grade. Considering that all the biopsies were collected at the same phase of the oestrous cycle, processed and stained the same and evaluated by the same operator these grade variations can be attributed to a low representativeness of a single biopsy sample.

Reduction in fibrosis has been reported after DMSO infusion (LEY *et al.*, 1989), mechanic curettage (RICKETTS & BARRELET, 1997) or kerosene infusion (ROBERTS, 1992). In the present work, reduction was not being attributed to treatments. The hypothesis of reversibility could be associated with an individual ability to reduce the amount of collagen deposition. However, it cannot explain the improvement in ten days

observed in some mares, which enforces the hypothesis of low representativeness of a single biopsy sample.

On the other hand, the worsening of biopsy grades observed in 40% of the mares could be associated with increased age, with infiltration of inflammatory cells in the *stratum spongiosum* or with deficient protein secretion by the endometrium (HEIN, 2000). Several studies have been conducted to elucidate the ethiology, pathogenesis and evolution of the endometrosis, but none of them can explain changes in ten day's time.

It can be concluded that experimental infections repeated during 12 months did not influence the mean grade of endometrosis and angiosclerosis despite the variability within mares. It is very likely that a single uterine biopsy is not representative of the entire endometrium in the diagnosis of degenerative changes.

### 3.4 - ARTIGO 4

Submetido à *Theriogenology* em 5/02/2007

#### Effect of repetitive experimental bacterial infections on uterine degeneration in the mare<sup>a</sup>

Endometrial degeneration after repetitive infections

A. Keller<sup>a</sup>; A.P. Neves A; H. Aupperle<sup>b</sup>; K. Steiger<sup>b</sup>; E. Malschitzky<sup>a</sup>; P. Garbade<sup>a</sup>;  
R.M. Gregory<sup>a</sup>; H-A Schoon<sup>b</sup>; E. Klug<sup>c</sup>; R.C. Mattos<sup>a,d\*</sup>.

<sup>a</sup>*Reprolab, Departamento Medicina Animal; UFRGS, Porto Alegre, Brazil;*

<sup>b</sup>*Institut für Veterinär Pathologie, Universität Leipzig; Germany;*

<sup>c</sup>*Klinik für Pferde, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany*

<sup>d</sup>*Pesquisador do CNPq, Brazil*

#### Abstract

The objective of this study was to determine whether endometrial fibrosis and angiosis in the mare were influenced by successive experimental bacterial infections. Twenty oestrous mares were experimentally infected by inoculation of *Streptococcus equi* into the uterus. Prior to and on the fifth day after a bacterial inoculation, endometrial biopsies specimens were obtained and scored for degeneration. Seven days post-inoculation, mares received an intrauterine infusion of penicillin. Each mare was submitted to five successive infections at intervals between successive infections ranging from 60 to 180 days. There was no significant difference between grade of endometrosis

---

\* This work was supported by PROBRAL/CAPES/DAAD program

prior to the first experimental infection and on the fifth day after the last infection. Mares did differ, however, in the degree of endometrosis in the biopsies taken before and after an experimental infection. Only one mare kept the same grade during the entire experiment. Similarly, only three mares presented the same grade of endometrosis in 80% of the biopsies collected. Whereas in 25% of the mares, the same grade was maintained between the first and the last biopsies, in 35% of mares the latter grade was lower and in 40% the latter grade was higher than the former. In 9 mares there was a difference of 2 scores and in 10 mares a difference of 3 scores between initial and final grades of endometrosis. It can be concluded that, despite variability among mares, experimental infections did not influence average grade of endometrosis or angiosclerosis following experimental bacterial infection. It is likely that a single uterine biopsy is not representative of the entire endometrium for the diagnosis of degenerative changes.

*Keywords:* endometrosis, angiosis, endometritis, experimental infection, endometrial biopsy

## **1. Introduction**

Endometrosis, also known as chronic degenerative endometritis, describes a periglandular and/or stromal endometrial fibrosis which includes glandular alterations in fibrotic foci (HOFFMANN, 2003). Endometrial fibrosis, a major cause of reduced reproductive efficiency in mares, is a progressive, irreversible condition that tends to worsen with age. It is aggravated by frequent endometrial challenges such as coitus, infection and pregnancy (RICKETTS & ALONSO, 1991). Degenerative changes of the endometrium may result from repeated inflammation (TROEDSSON, 1997) or be a sequel to uterine infection or uterine therapy (VAN CAMP, 1993). Any injury that causes an inflammatory reaction may induce fibrosis. After initiation, the replacement of tissue by fibroblasts and the accumulation of extracellular matrix can continue despite healing of the initial injury (CADARIO *et al.*, 2002). However, neither a pregnancy nor seasonal and/or cyclical endocrine variations seem to have a remarkable influence on the progress of endometrosis (SCHOON *et al.*, 1992).

Angiosis of the equine endometrium is detected in varying severity and extent in nearly 80% of brood mares. Only younger maiden mares generally have intact vessels. Older maiden mares show a mostly mild sclerosis within the *intima* and the *adventitia*. In multiparous mares, alterations affect all layers of the vessel walls, and the incidence increases within the number of foals delivered (SCHOON & SCHOON, 2003). Compared to younger mares, decreased elasticity of vessels and higher degrees of fibrosis in older mares lead to chronic hypoxia, which probably affects fibrogenic cytokine production and release (CADARIO *et al.*, 2002).

Diagnosis of endometrial fibrosis and angiosis is confirmed by endometrial biopsy (TROEDSSON, 1997; SCHOON & SCHOON, 2003). A single biopsy has been considered representative of the entire uterus (RICKETTS, 1975, KENNEY, 1978, BLANCHARD *et al.*, 1987), but some studies have shown variation among sites in the same mare (DYBDAL *et al.*, 1999).

The objective of this experiment was to determine whether successive experimental bacterial infections of the uterus influence endometrial fibrosis and angiosis in the mare.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Animals*

Twenty 8-to-12-yr-old mares with unknown reproductive history were infected experimentally during five oestrous cycles over a 12 month interval.

### *2.2. 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 and 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 Brazil – 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 (v : v) at 37 °C for 24 hours 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 was then re-suspended in PBS to a final concentration of  $1 \times 10^9$  bacteria/mL. The suspension was aliquoted into 20 mL vials (Eppendorf do Brazil – São Paulo) and kept at 5 °C until use.

### 2.3. Experimental Infections

Before each experimental infection, mares were examined for reproductive soundness, including evaluation of perineal conformation, palpation per rectum and ultrasound visualization of the genital tract, vaginal examination with speculum, bacteriological cultures and cytology of the endometrium and an endometrial biopsy (pre-infection sample). Only clinically normal mares with negative cytology and bacterial cultures were used (n = 20).

Mares were synchronized with prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (Lutalyse 5 mg im – Pharmacia Brazil Ltda., São Paulo) to be in estrus and to have a dominant follicle at the time of infection. When a dominant follicle ( $\geq 35$  mm) was detected during oestrus, the uterus was infused with  $1 \times 10^9$  *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* suspended in 20 mL PBS.

On the fifth day after the bacterial inoculation, an endometrial biopsy specimen was obtained (post-infection sample); and on the seventh day post-infection, all mares received an intrauterine infusion of  $5 \times 10^6$  IU penicillin G (Ariston Industrias Químicas, São Paulo, Brazil). A new endometrial biopsy (2<sup>nd</sup> pre-infection sample) was taken just before the mares were next infected.

Because 20 mares were used and each was submitted to five successive infections, a total of 100 infections were performed. The time interval between the first pre-infection and the second post-infection biopsy was around 60 days, and the time interval between the third pre-infection and the fifth post-infection biopsy around 90 days. Mares became anoestrus in winter between the second post-infection and the third pre-infection biopsy, and that interval was approximately 180 days.



### 2.3 Endometrial Biopsy

The mares had their perineal area washed and cleaned. The biopsy instrument, a 50-cm alligator jaw forceps with a 1 x 2 cm cutting area, was placed in the bifurcation area of the uterus. A biopsy specimen was then taken from the dorsal aspect of the uterine body. The biopsied tissue was fixed in 10% formalin until it was embedded in paraffin, sectioned (3-4  $\mu\text{m}$  thickness) and stained with hematoxylin-eosin (HE).

Endometrial biopsies were classified according to the amount and severity of endometrial periglandular fibrosis, formation of nests, stromal fibrosis, lymphatic lacunae and angiosclerosis. All samples were evaluated in a blind manner as described by Kenney and Doig (1986) but modified (SCHOON et al., 1992) to observe only the degenerative process. Distribution and severity of inflammation were not considered in the categorization of biopsies.

Endometriosis was classified as follows: Grade I, no periglandular fibrosis or nests (figure 1A); Grade III, severe endometriosis presenting diffuse periglandular fibrosis with 10 or more layers, with >4 nests per field and many lymphatic lacunae (Fig. 1E); Grade IIA, slight endometriosis with diffuse periglandular fibrosis, with 1 to 3 layers, < 2 nests per field and few lymphatic lacunae (Fig. 1B); Grade IIB, diffuse periglandular fibrosis with 5 to 10 layers, 2 to 4 nests per field and occasional presence of lymphatic lacunae (Fig. 1C and 1D).

Angiosclerosis was also recorded but was not used as a classification criterion for the degree of endometriosis (SCHOON et al., 1992). The amount of collagen and elastic fibers and the *intima*, *media* and *adventicia* layers of arteries and veins of the endometrium were evaluated.

### 2.4 Statistical analysis

The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), with statistical significance accepted at  $P < 0.05$ . Endometriosis grades were converted to numerical scores: grade I = 1, grade IIA = 2, grade IIB = 3, grade III = 4. Angiosclerosis scores were: absent = 1, mild = 2, moderate = 3 and severe = 4. The base 10 logarithms of endometriosis degree and angiosclerosis score were used as dependent variables.

Statistical analysis of the experiment was carried out using the General Linear Model procedure.

### 3. Results

All the 20 mares presented clinical signs of endometritis 24 hours after the experimental infection. Average  $\log_{10}$  endometrosis grades during the five experimental infections are shown in figure 2. Endometrosis grades prior to and five days after each successive infection did not differ significantly ( $P = 0.168$ ). Similarly, endometrosis grades did not differ among biopsies taken before the five successive infections ( $P = 0.299$ ) or among the five biopsies taken on the fifth day after each infection ( $P = 0.305$ ).

Fig. 2

There were significant differences among mares in endometrosis degree in biopsies taken before ( $P = 0.020$ ) and after the experimental infection ( $P = 0.006$ ). Only one mare (No. 5) kept the same endometrosis grade throughout the experiment; whereas three mares (No. 5, 6 and 8) presented the same grade of endometrosis in 80% of their biopsies. In 25% of the mares, endometrosis grade was the same on their first and last biopsy, in 35% of mares, the last grade was lower than the first, and in 40% of mares, the last grade was higher than the first (Table 1). Only one mare (No. 5) had the same endometrosis score on every biopsy. Nine mares (No. 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 16 and 19) had two distinct endometrosis scores, and 10 mares (1, 2, 6, 11, 13, 14, 15, 17, 18 and 20) had three. Pre and post infection biopsy scores differed in 41% of the experimental infections.

Fig. 3

There was no significant difference in degree of angiosclerosis as assessed prior to the infections versus on the fifth day after the last infection ( $P = 0.168$ ). Similarly, no

differences were observed in angiosclerosis scores among biopsies before infections ( $P = 0.455$ ) or among biopsies collected at the fifth day after infection ( $P = 0.326$ ) (Fig 3).

#### 4. Discussion

Successive experimental bacterial infections and subsequent uterine inflammatory reactions did not influence the grade of endometriosis of uterine biopsies. We had expected endometriosis grade would either stay the same or worsen as a consequence of successive bacterial insults. However, substantial variation among repeated endometriosis grades of the same mare was detected. Ten biopsies were collected from each mare, and only one mare showed the same grade of endometriosis throughout the experiment. Ten mares had three different scores, sometimes improving as cumulative bacterial challenge increased. Considering that all the biopsies were collected at the same phase of the oestrous cycle, processed and stained by the same procedures and evaluated by the same technician, this variability within individual mares may reflect that any single biopsy sample is not representative of the entire endometrium. Based upon observations of 110 mares, Waelchli & Winder (1989) reported variability among uterine sections obtained from the same mare and affirmed that such differences often were due to variation in the distribution of fibrotic lesions. Similarly Dybdal *et al.* (1999) concluded that endometrial biopsies collected from various uterine sites were not uniform in histological features and that biopsies could vary considerably within a mare. Blanchard *et al.* (1987), however, concluded that one biopsy was generally representative of the entire endometrium.

The reduction in fibrosis grade between the first and the last biopsy observed in 35% of the mares disagrees with observations of several authors who concluded that fibrosis is irreversible (KENNEY & DOIG, 1986), even after different therapeutic treatments (BRACHER *et al.*, 1997; SCHOON *et al.*, 1997). Contrarily, reduction in fibrosis has been reported following DMSO infusion (LEY *et al.*, 1989), mechanical curettage (RICKETTS & BARRELET, 1997) and kerosene infusion (ROBERTS, 1992). The degree of reversibility could be associated with variation among individuals in ability to reduce the amount of collagen deposition. However, this would not explain the improvement observed in some mares between pre and post-infection biopsies (a 10 day

span), which reinforces the conclusion that single biopsy samples may be poorly representative of the entire organ.

Biopsy grades worsened over time in 40% of the mares, which could be associated with increased age or with infiltration of inflammatory cells in the *Stratum spongiosum* (HEIN, 2000). Several studies have examined the etiology, pathogenesis and evolution of endometriosis. Initial alterations are associated with the presence of periglandular stromal cells, type I synthesizing collagen fibers and slight alterations of the glandular basement membrane (RAILA *et al.*, 2001). Compared to non-affected glands, the epithelia of fibrotic glands are characterized by cycle-asynchronous differentiation (RAILA, 2000). Subsequently, epithelial degeneration and glandular dilatation are initiated (SCHOON *et al.*, 1992). As a result, marked differences occur among fibrotic foci in histochemical patterns (SCHOON *et al.*, 1995) as well as in the expression of steroid hormone receptors, proliferation intensity (AUPPERLE *et al.*, 1999) and intermediate filaments (AUPPERLE, 1997). However, this presumes endometriosis etiology and pathogenesis cannot explain the worsening in endometrial fibrosis within a ten-day interval. These findings reinforce the hypothesis that a single biopsy sample may not accurately reflect uterine degeneration.

It can be concluded that five experimental infections during a 12 month interval did not influence the mean grade of endometriosis and angiosclerosis, despite the variability within individual mares. It is likely that a single uterine biopsy is not representative of the entire endometrium in the diagnosis of degenerative changes.

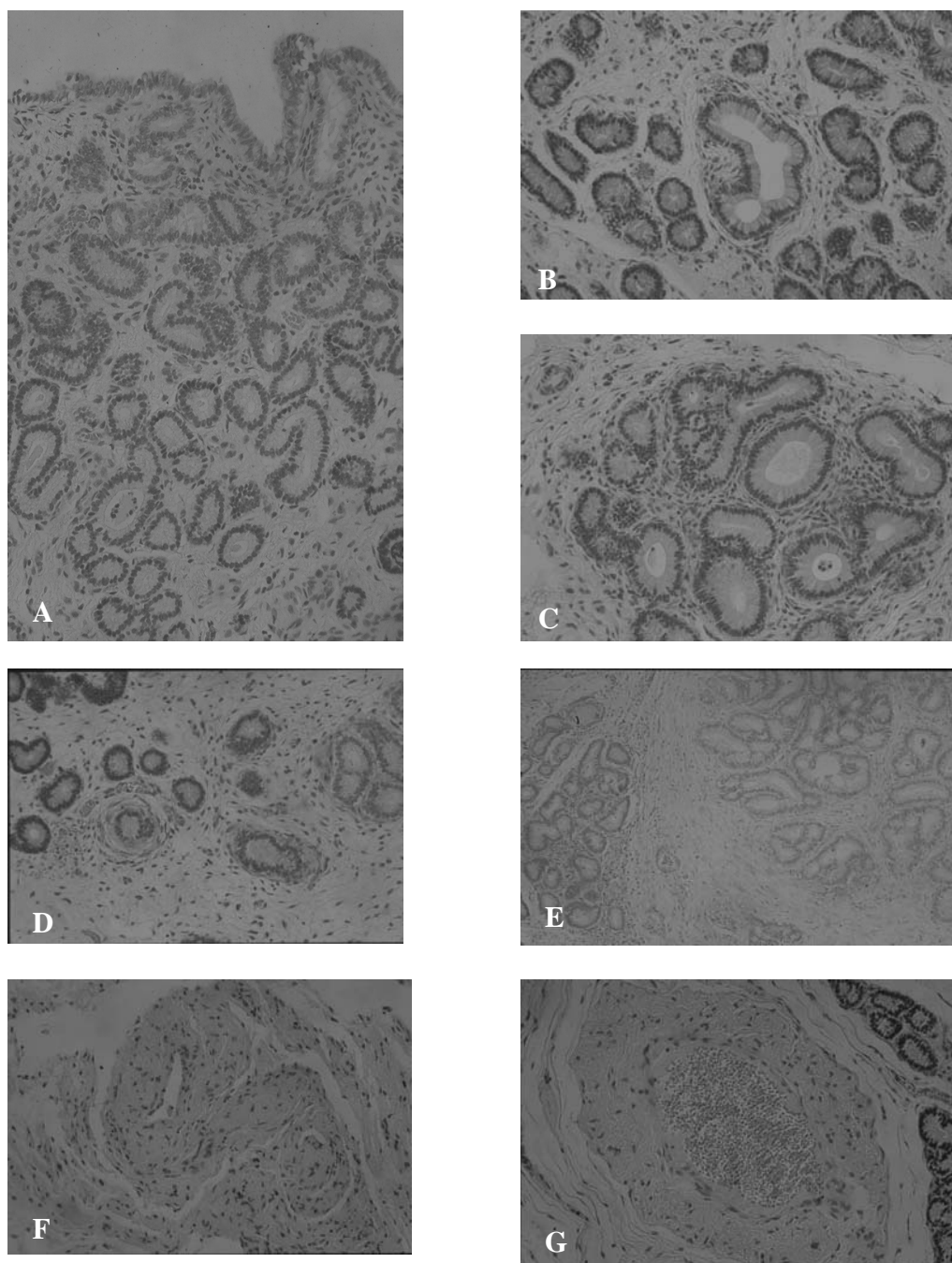


Figure 1 – Photomicrographs of equine endometrial samples with different endometriosis grades [6], (stained with H-E): A (x 200) - Grade I; B (x 200) - grade IIa; C (x 400x) - grade IIb with nests formation; D (x 400) - grade IIb diffuse endometriosis; E (x 200) – grade III; F (x 400) – vessel without alteration; G (x 400)- angiosclerosis grade III.

Table 1 - Endometriosis grade [reference 6] of biopsies obtained from 20 mares before and after each of five experimental *Streptococcus equi* infections

MARES No.	1 <sup>st</sup> Infection		2 <sup>nd</sup> Infection		3 <sup>rd</sup> Infection		4 <sup>th</sup> Infection		
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST	
1	1	2	2	3	2	1	1	1	1
2	2	3	2	2	2	2	1	1	1
3	2	1	1	1	1	2	1	/	1
4	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5	3	3	3	3	/	3	3	3	3
6	1	1	3	3	3	3	3	3	3
7	2	2	2	2	2	/	2	3	3
8	2	3	2	2	2	3	2	2	2
9	2	2	2	2	2	2	1	1	2
10	2	2	1	2	2	2	1	2	2
11	3	2	3	3	2	2	2	2	2
12	2	2	2	2	2	1	1	2	1
13	3	1	2	2	1	1	1	1	1
14	2	3	1	2	1	2	2	3	1
15	2	/	2	2	1	1	1	2	2
16	1	1	2	2	1	2	2	2	1
17	2	3	3	2	3	3	2	1	2
18	2	2	2	2	2	2	2	1	1
19	1	1	1	1	1	2	1	1	2
20	2	3	4	3	3	2	3	2	2

1 = Grade I; 2 = Grade IIa; 3=Grade IIb; 4= Grade III; / = lost biopsy

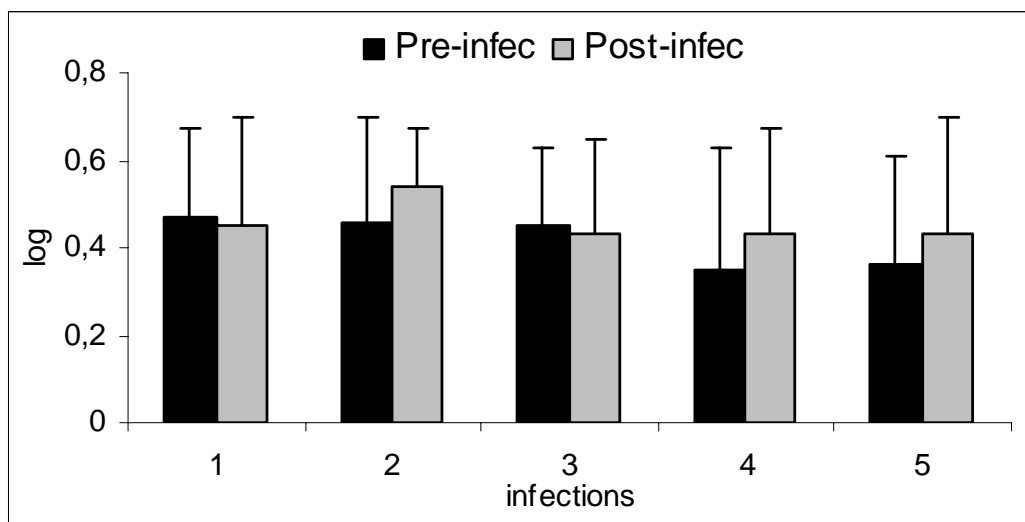


Figure 2 – Mean  $\log_{10}$  endometriosis grades of uterine biopsies collected before and after each of five experimental infections. Pre-infection biopsies  $P = 0.299$ ; post-infection biopsies  $P = 0.305$ .

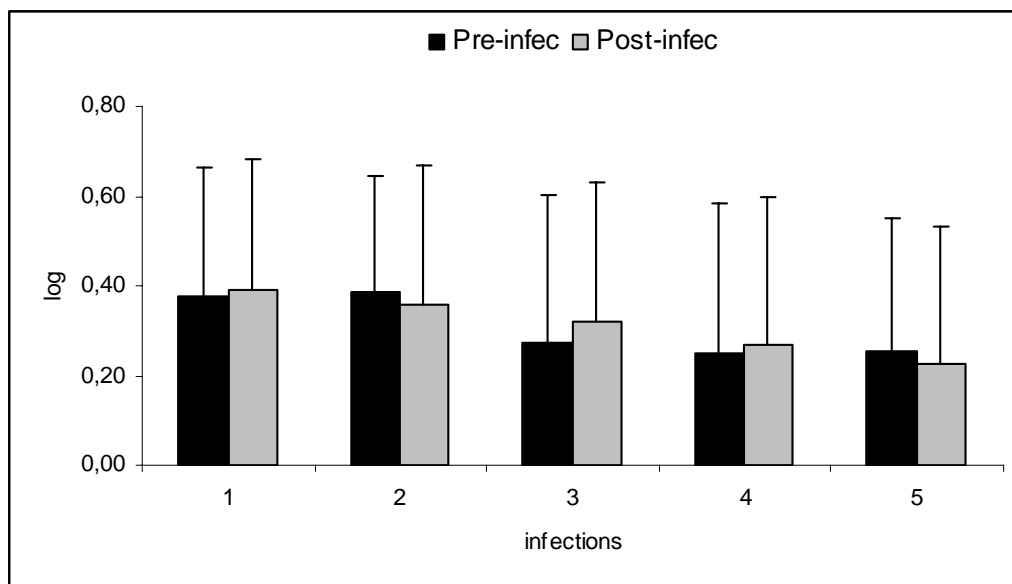


Figure 3 - Mean log<sub>10</sub> angiosclerosis scores of biopsies collected before and after each of five experimental infections. Pre-infection biopsies  $P = 0.455$ , post-infection biopsies  $P = 0.326$ .



#### 4 CONCLUSÕES

Éguas susceptíveis à endometrite, com presença de *Streptococcus* no útero, não apresentam neutrofilia cinco dias após a infecção. Provavelmente, o menor tempo de eliminação bacteriana observada após tratamento com leucócitos frescos e congelados deve-se a outros fatores que não a quimioatração exercida por essas células.

Cinco infecções experimentais durante um período de 12 meses não influenciaram no grau médio de endometrose e angiosclerose apesar da variação individual entre as éguas. A variação observada deve-se à baixa representatividade de uma única amostra de biópsia para a avaliação diagnóstica do grau de degeneração endometrial.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDONEGUI, G.; TREVANI, A.S.; LÓPEZ, D.H.; RAIDEN, S.; GIORDANO, M.; GEFNER, J.R. Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. **J 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, n. 2, p. 387-393, 1984.
- ASBURY, A.C. Failure of uterine defense mechanisms. In: ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine 2**. Filadélfia, W.B. Saunders, 1987.
- ASBURY, A.C.; HALLIWELL, R.E.W.; FOSTER, G.W.; LONGINO, S.J. Immunoglobins in the uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. **Theriogenology**, v.4, p.299-304, 1980.
- ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. Infectious causes of infertility. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Febiger, p. 381-391, 1993.
- ALLEN, W.E. Investigations into the use of exogenous oxytocin for promoting uterine drainage in mares susceptible to endometritis. **Vet.Rec.**, v.128, n. 25, p. 593-594, 1991.
- ALLEN, W.E.; PYCOCK, J.F. Cyclical accumulation of uterine fluid in mares with lowered resistance to endometritis. **Vet.Rec.**, v.122,p. 489-490, 1988.
- ASHWORTH, C.J. Maternal and conceptur factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Prod. Sci.**, v. 44, p. 99-105, 1995.

AUPPERLE, H. **Imunohistologische Untersuchungen am Endometrium der Stute.**

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária de Leipzig, Alemanha, 1997.

AUPPERLE, H.; ÖZGEN, H.; SCHOON, H.-A.; SCHOON, D.; HAPPEN, H.O.; SIEME, H.; TANNAPFEL, A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Vet J**; v. 32, p. :228-232, 1999.

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. **Pferdeheilkunde**, abstract, v.5, p. 544, 1997.

BARTMANN, C. P.; BRICKWEDEL, I.; FRÜHAUF, B.; WACHHOLZ, M.; SCHOON H.A.; KLUG, E. Ovar tumor bei der Stute – Diagnose und chirurgische Behandlung. **DVG-Tagungsbericht, 15. Arbeitstagung “Fachgruppe Pferdekrankheiten”**, Wiesbaden, 1998.

BERGMAN, R.V.; KENNEY, R.M. Representativeness of a uterine biopsy in the mare. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, p. 355-361, 1975.

BLANCHARD, T.L.; GARCIA, M.C.; KINTER, L.D.; KENNEY, R.M. Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare. **Theriogenology**, v. 28, n. 4, p. 445-450, 1987.

BLÜTHGEN, U. **Untersuchungen zu Vorkommen, Nachweis und Bedeutung von Eosinophilen Granulozyten im Endometrium der Stute unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens von Sprosspilzen.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária de Leipzig, Alemanha, 2001.

- BLUE, M.G. Mycotic invasion of the mare's uterus. **Vet. Rec.**, v. 113, p. 131-132, 1983.
- BRACHER, V. Treatment of CDE: Chemical curettage with irritant solutions. Proc. J.P. Hughes International Workshop on Equine endometritis, **Equine Vet. J.**, v. 25, p. 187, 1992.
- BRACHER, V.; GERSTENBERG, C; ALLEN, W.R. Der Einfluss von Endometrose (degenerativer Endometriumserkrankungen) auf Fruchtbarkeit, Plazentation und fötale Entwicklung beim Pferd. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 465-473, 1997.
- BRENNEIS, H.; HÄNSCH, G. Granulozytenfunktiosstörungen: Formen und Diagnostik. **Dtsch. Med. Wschr.**, v. 118, p. 1117-1129, 1993.
- BRUNCKHORST, D.; SCHOON, H.A. Stellenwert der histologischen Untersuchung von Uterusbiopsien bei der Diagnose von Fertilitätsstörungen der Stute. In: **Dtsch. Vet. Med. Ges.**, v. 11, p. 181-189, 1990.
- BRUNCKHORST, D.; SCHOON, H.A.; BADER, H.; SIEME, H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus der Stute. **Fertilität**, v. 7, p. 44-51, 1991.
- BURNS, S.J.; SIMPSON, R.B.; SNELL, J.R. Control of microflora in stallion semen with a semen extender. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n. 23, p. 139-142, 1975.

- CADARIO, M.E.; LOSINNO, L.; GIGUERE, S.; AGUILAR, J.; JACK, T.J.; MACPHERSON, M.; FITZPATRICK, C.; UHL, E.W. Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. **Theriogenology**, v. 58, p. 449-452, 2002.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, v. 37, p. 1101-1115, 1992.
- CARRE, P.; LEOPHONTE, P. Cytokines and pulmonary fibrosis. **Rev. Mal. Respir.**, v. 10, n. 3, p. 193-207, 1993.
- 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.
- CASTILHO, L.F.F. **Untersuchung zur Separation, Gefrierkonservierung und Applikation von zirkulierenden polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zur Behandlung der Gebärmutterschleimhautentzündung beim Pferd.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 1998.
- CASTILHO, L.F.F.; ZERBE, H.; RABE, U.; LEIBOLD, W.; KLUG, E. Isolierung und Gefrierkonservierung von immunokompetenten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zur Endometritisbehandlung beim Pferd. I. Int. Konferenz über Endometritis – Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde**, v. 13, n. 5, p. 437-444, 1997.
- COLLINS, S.M. A study of the incidence of cervical and uterine infections in Thoroughbred mares in Ireland. *Vet. Rec.*, v. 76, p. 673-675, 1964.

- DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. **Textbook of veterinary histology**, Filadélfia: Lea & Febiger, v. 3, p. 330-334, 1987.
- DOIG, P.A.; McNIGHT, J.D.; MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. **Can. Vet. J.**, v. 22, p. 72-76, 1981.
- DOIG, P. A.; WAELCHLI, R.O. Endometrial biopsy. In: McKINNON, A.O.; VOSS J.L. **Equine Reproduction**, Filadélfia: Lea & Febiger, p. 225-233, 1993.
- DYBDAL, N.O.; DAELS, P.F.; COUTO, M.A.; HUGHES, J.P.; KENNEDY, P.C. Investigation of the reliability of a single endometrial biopsy sample, with a note on the correlation between uterine cysts and biopsies grade. **J Reprod Fertil** , v.44 (Suplemento), p. 697, 1999.
- 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, n. 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.
- FISHER, B.; BEIER, H.M. Uterine environment in early pregnancy. In: SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.: **Embryonic mortality in farm animals**. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands, p. 93-108, 1986.
- FLORES, J.M.; RODRIGUEZ, A.; SANCHEZ, J.; GOMEZ-CUETARA, C.; RAMIRO, F. Endometriosis in the mares: incidence of histopathological alterations. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 30, p.61-65, 1995.

- FREEMAN, D.A.; ROSZEL, J.F.; SLUSHER, S.H.; CASTRO, M. Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions. **Theriogenology**, v. 33, p. 799-808, 1990.
- FREEMAN, K.P.; ROSZEL, J.F.; SLUSHER, S.H.; PAYNE, M. Mycotic Infections of the Equine Uterus. **Equine Practice**, v.8, n. 1, p. 34-42, 1986.
- FREEMAN, D.A.; WOODS, G.L.; VANDERWALL, D.K.; WEBER, J.A. Embryoinitiated oviductal transport in the mare. **J. Reprod. Fert.**, v. 95, p. 535-538, 1992.
- GORDON, J.R.; SARTIN, E.J. Endometrial biopsy as an aid to diagnosis and prognosis in equine infertility. **J. Equine Med. and Surg.**, v. 2, p. 328-336, 1978.
- GROSS, T.L.; LEBLANC, M.M. Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 184, n. 11, p. 1379-1382, 1984.
- GRÜNINGER, B. U. **Zur Pathogenese von Angiopathien im Endometrium der Stute – Morphologisch-funktionelle Untersuchungen**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária de Leipzig, Alemanha, 1996.
- GUYTON, A. C. The lymphatic system. In: **Text-book of Medical Physiology**, Filadélfia, W.B. Saunders, p. 180-184, 1991.
- HEARN, P.; BONNETT, B.; SAMPER, J.C. Factors influencing pregnancy on a Thoroughbred studfarm. **Equine Vet. J.**, v. 25, p. 192, 1993.
- HEIN, K. **Morpho-funktionelle Untersuchungen an der Cervix uteri und am Endometrium der Stute im Verlauf des Zyklus**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha. 2000.

- HOFFMANN, C.; BAZER, F.W.; KLUG, J.; ALLEN, W.R.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H.A. Morpho-funcional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions – preliminary results. **Pferdeheilkunde**, v. 19, n. 6, p. 666-669, 2003.
- HUGHES, J.P.; LOY, R.G. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. **Equine Vet. J.**, v. 7, p. 155-159, 1975.
- HURTGEN, J.P.; CUMMINGS, M.R. The diagnosis and treatment of fungal endometritis in mares. Proc. Ann. Meet. Soc. Theriogenol., p. 18-22, 1982.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Allergy and Hypersensitivity. In: **Immunobiology**. Fourth edition, Current Biology Publications, London, 1999.
- KENNEY, R.M. Prognostic value of endometrial biopsy of the mare. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. 23, p. 347-348, 1975.
- KENNEY, R.M. Clinical aspects of endometrial biopsy in fertility evaluation of the mare. In: Proc. **23<sup>rd</sup>. Ann. Conv. Americ. Assoc. Equine Pract.**, p. 105-122, 1977.
- KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on embryonic death. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 172, 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, n. 3, p. 185-186, 1992.
- KENNEY, R.M. BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W.. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. **Proc Am Ass Equine Pract**, p.237-336, 1975.



- KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. **Equine endometrial biopsy**. In: MORROW, D.A. Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Comp., p.723-729, 1986.
- KRIESTEN, H. **Zur prognostischen Bedeutung von Angiopathien im Rahmen der Kategorisierung von Endometriumbiopsien bei der Stuten**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 1995.
- LEBLANC, M.M. Oxytocin – the new wonder drug for treatment of endometritis? **Equine Vet. Educ.**, v. 6, p. 39-43, 1994.
- LEBLANC, M.M.; ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, p. 864-867, 1989.
- LEBLANC, M. M.; JOHNSON, R.D.; CALDERWOOD, M.B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic Clearance of India Ink in Reproductively Normal Mares and Mares Susceptibles to Endometritis. **Biol. of Reprod.**, (Monograpy Series), v.1, p.501-506, 1995.
- LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, A.C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurements of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Vet. J.**, v. 26, n.2, p. 109-113, 1994.
- LEISHMANN, D.; MILLER, R.B.; DOIG, P.A. A quantitative study of the histological morphology of the endometrium of normal and barren mares. **Can. J. Comp. Med.**

**Vet. Sci.**, v. 46, p. 17-20, 1982.

LEY, W.B.; BOWEN, J.M.; SPONENBERG, B.P.; LESSARD, P.N. Dimethyl Sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effects upon endometrial histological features and biopsy classification. **Theriogenology**, v. 32, p. 263-276, 1989.

LIEBICH, H.G. In: **Funktionelle Histologie**. Verlag Schattauer, Stuttgart, v. 2, p. 267-269, 1993.

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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 189, n. 6, p. 700-702, 1986.

LIU, I.K.M.; CHEUNG, A.T.W.; WALSH, E.M., MILLER, M.E.; LINDENBERG, P.M. Comparison of peripheral blood and uterine-derived polymorphonuclear leucocytes from mares resistant and susceptible to endometritis: chemotactic and cell elastimetry analysis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 46, n. 4, p. 917-920, 1985.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MATTOS, A.L.G.; GARBADE, P.; GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 495-498, 2002.

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 leucocytes on uterine bacterial clearance. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 27, n.1, p. 49-60, 1999a.

MATTOS, R.C.; MALSCHITZKY, E.; JOBIM, M.I.M. Endometrite na égua. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 2, p.150-157, 2003

- 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, n. 5, p. 512-515, 1997.
- 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, n. 2, p. 83-90, 1984.
- 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 leucocytes or combination of both treatment of postbreeding endometritis in the horse. **Pferdeheilkunde**, v. 15, n. 6, p. 584-587, 1999c.
- 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 ecboolic drugs and plasma enriched with leucocytes on uterine bacterial clearance. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 27, n.1, p. 61-72, 1999b.
- McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; SHIDELR, R.K. Diagnostic ultrasonography of the mare's reproductive tract. *Eq. Vet. Sci.*, v. 8, p. 329-333, 1988.
- McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Breeding the problem mare**. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine Reproduction*, Filadelfia:Lea & Fabiger, p. 368-378, 1993.
- 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, n. 19, p. 489-528, 1970.

- NEELY, D.P. Evaluation and Therapy of Genital Disease in the Mare. In: NEELY, D.P.; LIU, I.K.M.; HILLMAN, R.B. : **Equine Reproduction**, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey, p. 40-56, 1983.
- NEELY, D.P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G.H.; EDQUIST, L.E.; HUGHES, J.P. Prostaglandin release patterns in the mare: Physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. **J. Reprod. Fert.**, v.27 (Suplemento), p. 181-189, 1979.
- NEVES, A.P.; KELLER, A.; ENGELKE, F.; ZERBE, H.; LEIBOLD, W.; KLUG, E.; SCHOON, H.A.; MATTOS, R.C. Avaliação da migração por quimiotaxia, da vitalidade e da produção de radicais livres de oxigênio de leucócitos equinos frescos, congelados e lisados. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 199-206, 2004.
- 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, p.511-523, 1999.
- ÖZGEN, S.; RASCH, K.; KROPP, G.; SCHOON, H.A.; AUPPERLE, H.; SIEME, H.; KLUG, E. Aetiopathogenesis and Therapy of Equine Hydromucometra: Preliminary Data. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 533-536, 1997.
- PASCOE, D.R. Effect of adding autologous plasma to an intrauterine antibiotic therapy after breeding on pregnancy rates in mares. **Biol. Reprod. Mono. Ser.**, n.1, p. 539-543, 1995.
- PIMENTEL, C.A. Comunicação pessoal, 2004.
- PUGH, D.G.; BOWEN, J.M.; KLOPPE, L.H.; SIMPSON, R.B. Fungal Endometritis in Mares. **Continuing Education Article**, v. 8, n. 4, p. 173-181, 1986.

- PYCOCK, J.F.; NEWCOMBE, J.R. The relationship between intraluminal uterine fluid, endometritis and pregnancy rate in the mare. **Equine Pract.**, v. 18, p. 19-22, 1996.
- RAILA, G. **Zur Pathogenese der Endometrose der Stute – Morphologische funktionelle Untersuchungen**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária de Leipzig, Alemanha, 2000.
- RAILA, G.; AUPPERLE, H.; MENGER, S.; SCHOON, D.; SCHOON, H.-A. Pathogenesis of equine endometrosis –ultrastructure and immunohistology. **Pferdeheilkunde**, v. 17, p. 684-685, 2001.
- RAILA, G.; SCHOON, H.A.; WREDE, S.; KLUG, E. Pathogenesis of equine endometrosis – an ultrastructural investigation. Abstract. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 550-551, 1997.
- 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 Vet. J.**, v. 28, n. 6, p. 455-460, 1996.
- REILAS, T. **Uterine luminal environment of the mare**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Helsinki, Finlândia. 2001.
- RICKETTS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **J. Reprod. Fert**, v. 23, p. 341-345, 1975.
- RICKETTS, S.W. Endometrial curettage in the mare. **Equine Vet. J.**, v. 17, p. 324-328, 1985.
- RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. Assesment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. **Equine Vet. J.**, v. 23, p. 185-188, 1991a.

- RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Vet. J.**, v. 23, p. 189-192, 1991b.
- RICKETTS, S.W.; BARRELET, A. A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK Thoroughbred mares over a 25 year period. **Pferdeheilkunde**, v. 13, n. 5, p. 525-530, 1997.
- RICKETTS, S.W.; BARRELET, A. The ability of mares to respond to treatment for uterine abnormalities diagnosed by endometrial biopsy and some causes for failure to respond – A review of 1099 cases. **Pferdeheilkunde**, v. 17, n. 6, p. 644-649, 2001.
- RICKETTS, S.W.; MACKINTOSH, M.E.. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. **J Reprod Fertil**, v.35, (Suplemento), p.343-351,1987.
- ROBERTS, C. Intrauterine kerosene in equids: Historical perspectives. Poc J.P. Hughes International Workshop on Equine endometritis, **Equine Vet. J.**, v. 25, p. 186, 1992.
- ROSSDALE, P. D. The uterus, an organ of many roles. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 427-439, 1997.
- RUNGE, A. **Zur Repräsentanz histologischer Untersuchungsbefunde an Uterusbiopsien bei der Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen der Stute**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária de Leipzig, Alemanha, 1995.
- SCHOON, H-A.; SCHOON, D. The category I mare: expected foaling rate 80-90% - Fact or fiction? **Pferdeheilkunde**, v. 19, p. 698-701, 2003.

- SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. **Pferdeheilkunde**, v. 8, p. 355-362, 1992.
- SCHOON, D.; SCHOON, H.A.; KLUG, E. Angiopathien im Endometrium der Stuten: Diagnose und prognostische Bedeutung. In: Dtsch. Vet. Med. Gesellschaft (Hrsg.), **Tagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten DVG**, Wiesbaden, v.13, p. 17-28, 1994.
- SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Die Endometrium biopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 453-464, 1997.
- SCHOON, D.; SCHOON, H.A.; KLUG, E. Angioses in the equine endometrium – Pathogenesis and clinical correlations. **Pferdeheilkunde**, v. 15, n. 6, p. 541-546, 1999a.
- SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KÖTTER, B.; RUNGE, A.; KLUG, E. Zur Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. In: Dtsch. Vet. Med. Gesellschaft: Bericht des **21. Kongresses der DVG**, Bad Nauheim, p. 273-282, 1995.
- SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; WIEGANDT, I.; BARTMANN, C.P.; AUPPERLE, H. Endometrial maldifferentiation – A clinically significant diagnosis in equine reproduction? **Pferdeheilkunde**, v. 15, n. 6, p. 555-559, 1999b.
- SCHOON, H.A.; WIEGANDT, I.; SCHOON, D.; AUPPERLE, H.; BARTMANN, C.P. Functional disturbances of the equine endometrium. **Proc. 7<sup>th</sup> Int. Symp. Equ. Repr.**, Pretoria 12-17 July, p. 103-104, 1998.
- SILVA, C.A.M Infecções uterinas na égua. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 8, Belo Horizonte, MG., 1989,

- SILVA, C.A.M.; DE BARROS, S.S.; ESQUERRE, R.A; DA SILVA, J.H.S. A biópsia endometrial na avaliação da fertilidade na égua. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 7, n. 4, p. 131-133, 1987.
- SLUSHER, S. H.; FREEMAN, K.; ROSZEL, F. Eosinophils in equine uterine cytology and histology specimens. **Javma**, v. 184, n. 6, p. 665-670, 1984.
- SQUIRES, E.L.; BARNES, C.K.; ROWLEY, H.S.; MCKINNON, <sup>ao</sup>; PICKETT, B.W.; SHIDELER, R.K. Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. Proc. **35<sup>th</sup> Ann. Conv. Am. Ass. Equine Pract.**, p. 25-30, 1989.
- STASHAK, T.S. Principles of wound healing. In: **Equine Wound Management**. Filadélfia: Lea & Febiger, p. 1-18, 1991.
- STEIGER, K. **Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur puerperalen endometrialen Involution der Stute unter besonderer Berücksichtigung peripartaler Störungen**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária de Leipzig, Alemanha, 2002.
- TROEDSSON, M.H.T. Diseases of the uterus. In: Robinson, N.D. (Ed) **Current Therapy in Equine Medicine**, Saunders Co., Philadelphia, p.517-523. 1997.
- TROEDSSON, M.H.T.; DEMORAES, M.J.; LIU, I.K.M. Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical response to intrauterine exposure with *Streptococcus zooepidemicus*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, n. 4, p. 570-572, 1993a.
- 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. Int. Konferenz über Endometritis – Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde**, v. 13, n. 5, p. 545, 1997.



- TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M. Uterine clearance of non-antigenic markers ( $^{51}\text{Cr}$ ) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infection. **J. Reprod. Fertil.**, v.44 (Suplemento), p.283, 1991.
- TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; ING, M.; PASCOE, J.; THURMOND, M.J. Multiple site electromyographic recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **J. Reprod. Fertil.**, v.99, p.307-313, 1993b.
- 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. **Biol. of Reprod.**, v. 49, p. 502-506, 1993c.
- TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; THURMOND, M. Function of Uterine and Blood-Derived Polymorphonuclear Neutrophils in Mares Susceptible and Resistant to Chronic Uterine Infection: Phagocytosis and Chemotaxis. **Biol. of Reprod.**, v. 49, p. 507-514, 1993d.
- TROEDSSON, M.H.T.; SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, n. 4, p. 468-472, 1995.
- TUNÓN, A.M.; KATILA, T.; MAGNUSSON, U.; NUMMIJÄRVI, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ. T-cell distribution in two different segments of the equine endometrium 6 and 48 hours after insemination. **Theriogenology**, v. 54, p. 835-841, 2000.
- VAN CAMP, S. D. Uterine abnormalities. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L: **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, p. 392-396, 1993

- VOGEL, H.J.; HUMKE, E. Der Formenzyklus der Uterindrüsen der Stute im Vergleich anderer Säugetiere und des Menschen. **Anat. Histol. Embryol.**, v.2, p. 271-279, 1973.
- WÄELCHLI, R.O.; CORBOZ, L.; WINDER, N.C. Effect of intrauterine plasma infusion in the mare: histological, bacteriological and cytological findings. **Theriogenology**, v. 28, n. 6, p. 861-869, 1987.
- WÄELCHLI, R.O.; WINDER, N.C. Distribution of histological lesions in the equine endometrium. **Vet. Rec.**, v. 124, p. 274-276, 1989.
- WAITES, G.T.; BELL, S.C. Glycogen-induced intrauterine leucocytosis and its effect on mouse blastocysts implantation in vivo and in vitro. **J. Reprod. Fert.**, v. 66, p. 563-569, 1982.
- WATSON, E.D. Uterine defence mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: A review. **Equine Vet. J.**, v.20, p.397-400, 1988.
- WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 201, n. 3, p. 438-440, 1992.
- 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, n. 2, p. 107-121, 1987.
- WATSON, E.D.; THOMSON, R.M. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. **Equine Vet. J.**, v. 28, n. 2, p. 106-110, 1996.

WEITZE, C.F.; PETZOLD, R.. Preservation of semen. *J Reprod Sc*, v. 28, p. 229-235, 1992.

WIDDERS, P.R.; STOKES, C.R.; DAVID, J.S.E. Effect of cycle stage on immunoglobulin concentrations in reproductive tract secretions of the mare. **J. Reprod. Immunol.**, v.7, p. 233-242, 1985.

ZALAVARY, S.; GRENEGARD, M.; STENDAHL, O.; BENGTSSON, T.. Platelets enhance FC(gamma) receptor mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purigenic modulation and actin polymerization. **J Leukoc Biol**, v. 60, p. 58-68, 1996.

ZENT, W. Post-ovulation antibiotics. *Equine Vet. J.*, v. 25, p. 191, 1993.

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. **J Vet Med**, v. 50, p.179-184, 2003a.

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

ZERBE, H.; SCHUBERTH, H.J.; ENGELKE, F.; FRANK, J.; KLUG, E.; LEIBOLD, W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 209-223, 2003b.

ZERBE, H.; SCHUBERTH, 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.

