

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

**ANÁLISE DO LÍQUIDO ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS À  
ENDOMETRITE: EFEITO DA CORTICOTERAPIA**

**CAROLINE ANTONIAZZI WOLF**

**PORTO ALEGRE  
2011**

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

**ANÁLISE DO LÍQUIDO ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS À  
ENDOMETRITE: EFEITO DA CORTICOTERAPIA**

**CAROLINE ANTONIAZZI WOLF**

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: RODRIGO COSTA MATTOS

Co-Orientadora: MARIA INÊS MASCARENHAS JOBIM

**PORTO ALEGRE  
2011**

W853a Wolf, Caroline Antoniazzi

Análise do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite: efeito da corticoterapia. / Caroline Antoniazi Wolf. - Porto Alegre: UFRGS, 2011.

150f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2011. Rodrigo Costa Mattos, Orient.; Maria Inês Mascarenhas Jobim, Co-orient.

1. Reprodução animal: Éguas 2. Endometrite  
3. Glicocorticóide 4. Óxido nítrico 5. Proteínas de fase aguda 6. Eletroforese bidimensional 7. Espectrometria de massa  
I. Mattos, Rodrigo Costa, Orient. II. Jobim, Maria Inês Mascarenhas, Co- Orient. III. Título

CDD 619.38

Catlogação na fonte preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Veterinária da UFRGS

**CAROLINE ANTONIAZZI WOLF**

**ANÁLISE DO LÍQUIDO ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS À  
ENDOMETRITE: EFEITO DA CORTICOTERAPIA**

**APROVADA POR:**

---

**Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos**  
**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Maria Inês Mascarenhas Jobim**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. Sandra Fiala**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. Eduardo Malschitzky**  
**Membro da Comissão**

*Aos meus Pais, que amo muito, pelo apoio e incentivo constantes e por me ensinarem o valor do estudo e da educação. Por me passarem seus valores e princípios, que foram, sem sombra de dúvida, o estímulo que nunca me deixou desistir dos meus ideais.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Rodrigo Costa Mattos, por me dar a oportunidade de realizar o doutorado. Pelo gosto e apoio à pesquisa científica, sem os quais não teria sido possível a realização do trabalho. Por tudo que aprendi e por, principalmente, acreditar no meu trabalho.

À Professora Maria Inês Mascarenhas Jobim, pelo empréstimo do laboratório de proteínas e do conhecimento sobre a eletroforese bi-dimensional.

Ao Professor Eduardo Malschitzky, pelo “ponta-pé” inicial e ajuda na realização do experimento.

À equipe do Laboratório Uniprot-MS, do Centro de Biotecnologia da UFRGS, especialmente ao Professor Charley Staats, pela realização da espectrometria de massa, que possibilitou à identificação das proteínas.

À colega Médica Veterinária Bianca do Prado Lima Petrucci, pelo companheirismo e pelas risadas nos dias, tardes e noites no laboratório.

Aos estagiários do Reprolab pela “bóia” de todos os dias aos animais.

À Médica Veterinária Sabrina Leães Gomez Lorenzoni, pelo ombro amigo nas horas difíceis.

Aos animais! Criaturas solicitadas em favor da ciência e do conhecimento científico.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino público e gratuito.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

*“In science, self-satisfaction is death. Personal self-satisfaction is the death of the scientist. Collective self-satisfaction is the death of the research. It is restlessness, anxiety, dissatisfaction, agony of the mind that nourish science.”*

**Jacques Lucien Monod (1910-1976)**

**RESUMO**  
**ANÁLISE DO LÍQUIDO ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS À**  
**ENDOMETRITE: EFEITO DA CORTICOTERAPIA**

Tese de Doutorado

Autor: Caroline Antoniazzi Wolf

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Co-Orientadora: Maria Inês Mascarenhas Jobim

A modulação da resposta inflamatória uterina equina recebe atenção, devido a um distúrbio imunológico, que parece ocorrer em uma população de éguas, classificadas como suscetíveis à endometrite. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da corticoterapia aplicada na presença e na ausência de inflamação uterina sobre a proteômica e a concentração de óxido nítrico no líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite. Éguas foram sincronizadas com 5 mg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  e após a verificação dos sinais de estro foram submetidas a quatro tratamentos. O primeiro foi o Controle, que não recebeu nenhum tipo de tratamento. O segundo foi o GC, onde as éguas receberam aplicação de um glicocorticóide, a cada 12 horas, por três dias consecutivos. O terceiro foi o Infectado, onde as éguas receberam uma infusão intrauterina de *Streptococcus zooepidemicus* ( $1 \times 10^9$ /mL) e o quarto foi o GC + Infectado, onde as éguas receberam a aplicação do glicocorticóide e a infusão intrauterina descrita acima. Doze horas após o final de cada tratamento, amostras de líquido endometrial puro e de lavados uterinos foram coletadas para análise proteômica e determinação de óxido nítrico, respectivamente. O primeiro artigo relata os dados preliminares da análise proteômica, com a contagem das bandas protéicas e a observação de 33 bandas protéicas no Controle, 54 no GC, 51 no Infectado e 72 no GC + Infectado. A corticoterapia pode induzir o aparecimento de um número maior de bandas protéicas, pois os géis com as maiores contagens foram nos tratamentos onde ela foi aplicada. No segundo artigo, foi realizada a identificação das bandas protéicas significativas, em relação à densidade óptica relativa e à frequência. A corticoterapia provocou uma alteração na proteômica do líquido endometrial, caracterizada pelo aumento e diminuição na densidade óptica relativa e na frequência de proteínas da fase aguda da inflamação, com as maiores alterações observadas quando a corticoterapia foi aplicada na presença do processo infeccioso. A infusão de *Streptococcus zooepidemicus* provocou alterações na proteômica do líquido endometrial, caracterizadas pelo aumento e diminuição na densidade óptica relativa e na frequência de proteínas da fase aguda da inflamação. Os resultados do estudo indicam que a corticoterapia provoca alterações imunológicas no endométrio equino, não apenas como depressiva, mas estimuladora da defesa local, através de uma ação imunomoduladora. No terceiro artigo, foi realizada a determinação da concentração de óxido nítrico, não sendo observada diferença significativa nos quatro tratamentos. Portanto, a corticoterapia provoca alterações proteômicas no líquido endometrial de éguas suscetíveis em estro, onde a presença de um estímulo inflamatório causado pela infusão intrauterina bacteriana induz a uma maior alteração, do que a ausência. A infecção do lúmen uterino provoca alterações proteômicas no líquido endometrial e a corticoterapia não influencia a concentração de óxido nítrico de éguas em estro.



**Palavras-chave:** endometrite, glicocorticóide, proteínas da fase aguda, eletroforese bi-dimensional, espectrometria de massa, óxido nítrico.

**ABSTRACT****ANALYSIS OF THE ENDOMETRIAL FLUID OF MARES SUSCEPTIBLE TO  
ENDOMETRITIS: EFFECT OF CORTICOTHERAPY***Thesis**Author: Caroline Antoniazzi Wolf**Adviser: Rodrigo Costa Mattos**Co-Adviser: Maria Inês Mascarenhas Jobim*

*The modulation of the equine uterine inflammatory response receives much attention, due to an immunological disorder, which appears to happen in a population of mares, classified as susceptible to endometritis. The aim of this study was to verify the effect of corticotherapy applied in the presence and in the absence of uterine inflammation on the proteomics and nitric oxide concentration of the endometrial fluid of mares susceptible to endometritis. Mares were synchronized with 5 mg prostaglandin F<sub>2α</sub> and after the observation of the signs of estrus were submitted to four treatments. The first was the Control, which did not receive any kind of treatment. The second was the GC, where mares received the administration of a glucocorticoid, each 12 hours, for three consecutive days. The third was the Infected, where mares received an intrauterine infusion of *Streptococcus zooepidemicus* (1x10<sup>9</sup>/mL) and the fourth was the GC + Infected, where mares received the administration of glucocorticoid and intrauterine infusion as described above. Twelve hours after the end of each treatment, pure endometrial fluid and uterine flushings were collected for proteomic analysis and nitric oxide determination, respectively. The first article reports the preliminary data of the proteomic analysis, where protein band counts were done, being observed 33 protein bands in Control, 54 in GC, 51 in Infected and 72 in GC + Infected. Corticotherapy can induce the appearance of a higher number of protein bands, because the gels with the highest counts were in the treatments where it was applied. In the second article, the identification of the significant protein bands was done, regarding the relative optical density and frequency. Corticotherapy provoked an alteration in the endometrial proteomics, characterized by an increase and a decrease on the relative optical density and frequency of inflammatory acute phase proteins, with the major alterations observed when corticotherapy was applied in the presence of an infectious process. *Streptococcus zooepidemicus* infusion provoked alterations in the endometrial fluid proteomics, characterized by an increase and a decrease on the relative optical density and frequency of inflammatory acute phase proteins. Results from this study indicate that corticotherapy provokes immunological alterations in the equine endometrium, not only as depressor, but enhancer of local defense, through an immunomodulatory action. In the third article, the nitric oxide concentration was determined, with no significant difference observed in the four treatments. So, corticotherapy provokes alterations in the proteomics of the endometrial fluid of susceptible mares in estrus, where the presence of an inflammatory stimulus caused by intrauterine bacterial infusion induces a major alteration, than the absence. Uterine lumen infection provokes alterations in the proteomics of the*

*endometrial fluid and corticotherapy does not influence nitric oxide concentration in mares in estrus.*

**Keywords:** *endometritis, glucocorticoid, acute phase proteins, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, nitric oxide.*

**LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1** Exemplo de um gel de poliacrilamida bi-dimensional de proteínas da secreção endometrial, grupo Controle. Gel bi-dimensional de SDS-PAGE a 12%, corado com Coomassie Blue. A seta horizontal na parte superior demonstra a direção do gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE), do terminal básico (+) para o ácido (-), na primeira dimensão. O marcador de peso molecular (escada) está à direita..... **58**

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	Resumo das principais APP e seu envolvimento no processo inflamatório.....	<b>35</b>
<b>TABELA 2</b>	Proteínas identificadas pela espectrometria de massa, ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e a banda correspondente no gel 2D SDS-PAGE expressa em números arábicos.....	<b>71</b>
<b>TABELA 3</b>	Densidade óptica relativa das bandas protéicas identificadas, nos diferentes tratamentos. Os valores representam a porcentagem relativa de pixels de cada banda, em relação à porcentagem da área total do gel.....	<b>71</b>
<b>TABELA 4</b>	Frequência relativa das bandas protéicas identificadas, nos diferentes tratamentos. Os valores indicam a porcentagem de aparecimento da banda no total de géis de cada tratamento.....	<b>72</b>
<b>TABELA 5</b>	Média e erro padrão da concentração do óxido nítrico nos lavados uterinos nos quatro tratamentos.....	<b>92</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Inflamação.....</b>	<b>17</b>
2.1.1	Resposta Inflamatória aguda.....	17
2.1.1.1	Neutrófilos.....	18
2.1.1.2	Imunoglobulinas.....	19
2.1.1.3	Complemento.....	20
2.1.1.4	Óxido Nítrico.....	21
2.1.1.5	Citocinas.....	22
2.1.1.6	Proteínas da fase aguda.....	23
2.1.1.6.1	Classificação das APP.....	25
2.1.1.6.2	$\alpha_1$ -antitripsina.....	26
2.1.1.6.3	Amilóide sérica A.....	27
2.1.1.6.4	Proteína C-reativa.....	28
2.1.1.6.5	Haptoglobina.....	28
2.1.1.6.6	$\alpha_1$ -glicoproteína ácida.....	30
2.1.1.6.7	Fibrinogênio.....	31
2.1.1.6.8	Ceruloplasmina.....	31
2.1.1.6.9	Transferrina.....	31
2.1.1.6.10	Transtiretina.....	33
2.1.1.6.11	Apolipoproteína A-1.....	34
2.1.1.6.12	Albumina.....	34

2.1.1.7	Actina.....	36
2.1.2	Endometrite.....	37
2.1.2.1	Endometrite persistente pós-cobertura.....	38
2.1.2.2	Infecção uterina com <i>Streptococcus zooepidemicus</i> .....	42
2.1.2.3	Líquido endometrial.....	43
2.1.2.3.1	Componentes do líquido endometrial.....	44
2.1.3	APP e a endometrite.....	46
<b>2.2</b>	<b>Glicocorticóides.....</b>	<b>47</b>
<b>2.3</b>	<b>Glicocorticóide no tratamento da endometrite.....</b>	<b>50</b>
<b>2.4</b>	<b>Eletroforese bi-dimensional.....</b>	<b>51</b>
<b>2.5</b>	<b>Espectrometria de massa.....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGOS.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Artigo 1. Endometrite persistente pós-cobertura: efeito do tratamento com corticosteróide sobre o número de bandas protéicas do líquido endometrial de éguas suscetíveis.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2</b>	<b>Artigo 2. Efeito da corticoterapia sobre a proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura.....</b>	<b>63</b>
<b>3.3</b>	<b>Artigo 3. Níveis de óxido nítrico em amostras uterinas de éguas suscetíveis após a corticoterapia.....</b>	<b>87</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>99</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
	APÊNDICE A – Sequência de peptídeos da $\alpha_1$ -antitripsina.....	139
	APÊNDICE B – Sequência de peptídeos da Haptoglobina.....	140
	APÊNDICE C – Sequência de peptídeos da Transtiretina.....	141
	APÊNDICE D – Sequência de peptídeos da Apolipoproteína A-1.....	142

APÊNDICE E – Sequência de peptídeos da Transferrina.....	143
APÊNDICE F – Sequência de peptídeos da IgG.....	144
APÊNDICE G – Sequência de peptídeos da Actina.....	145
APÊNDICE H – Esquema das interações das 23 bandas protéicas significativas nos quatro tratamentos: aumento (↑) ou diminuição (↓) em relação à densidade óptica relativa e à frequência.....	146
APÊNDICE I – Ilustração das 23 bandas protéicas significativas no gel 2D SDS-PAGE.....	147
APÊNDICE J – Artigo 1 publicado no periódico Pferdeheilkunde.....	148



## 1. INTRODUÇÃO

A modulação da resposta inflamatória uterina recebe bastante atenção nos últimos tempos (FUMUSO et al., 2007), uma vez que distúrbios neste fenômeno fisiológico ocorrem em uma população de éguas e contribuem para o insucesso reprodutivo desses animais (ZENT et al., 1998). Para tanto, a corticoterapia foi proposta (DELL'AQUA Jr. et al., 2006; PAPA et al., 2008). Os glicocorticóides participam de várias atividades fisiológicas, mas são mais conhecidos pelos seus efeitos anti-inflamatórios potentes (LECOQ et al., 2009). No entanto, efeitos pró-inflamatórios têm sido atribuídos, o que torna o mecanismo de ação destes agentes muito complexo. O tempo e o contexto de exposição celular é que irão determinar se a ação será inibidora ou estimuladora (GALON et al., 2002).

A corticoterapia prévia à cobertura tem sido considerada eficaz ao controlar a resposta inflamatória uterina de éguas suscetíveis à endometrite, proporcionando uma melhora nas taxas de prenhez (DELL'AQUA Jr. et al., 2006; PAPA et al., 2008) e melhor qualidade do líquido intrauterino (BUCCA et al., 2008). Entretanto, Vandaele et al. (2010) não verificaram influencia da corticoterapia sobre as taxas de prenhez, quando aplicada antes e depois de inseminação artificial.

A endometrite é a causa mais comum de infertilidade na égua (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1999) e representa grande perda econômica para os criadores de animais da espécie equina. Por isso, este problema reprodutivo tem sido muito estudado por vários pesquisadores (LIU et al., 1986; ZENT et al., 1998; ALGHAMDI et al., 2001; CAUSEY et al., 2006; LEBLANC et al., 2007; NIELSEN et al., 2010). A ampla variedade de estudos inclui desde o conhecimento detalhado da fisiopatologia da endometrite (TROEDSSON, 2006; MAISCHBERGER et al., 2008), assim como diversas formas de tratamento (GUTJAHR et al., 2000; LEBLANC, 2003a) e técnicas de diagnóstico (NIELSEN, 2005). No entanto, a eficiência reprodutiva das éguas melhorou relativamente pouco (METTE et al., 2010), considerando o foco da pesquisa, uma vez que a causa da suscetibilidade continua sem ser esclarecida.

Acredita-se que a limpeza uterina é fundamental para o sucesso da resolução da endometrite, sendo a contratilidade uterina necessária para que isso ocorra (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1999). As éguas suscetíveis possuem a contração miometral deficiente e acumulam líquido intrauterino e, conseqüentemente, os produtos da inflamação (ALGHAMDI & TROEDSSON, 2002). Dentre estes produtos está o

óxido nítrico, uma molécula de sinalização celular, que dentre outras ações, causa o relaxamento da musculatura lisa (RODEBERG et al., 1995). Este mediador inflamatório tem sido sugerido como um dos fatores que predis põem ao atraso na limpeza uterina, pois prejudica a contração miometral (ALGHAMDI et al., 2005). Acredita-se, também, que as éguas suscetíveis possuem o sistema imune uterino desequilibrado, diferente do das resistentes, entretanto pouco se sabe sobre estas diferenças. Com a finalidade de elucidar as alterações locais que ocorrem na endometrite, a composição do líquido endometrial tem sido estudada (MALSCHITZKY et al., 2003; METTE et al., 2010). Foi demonstrado que existem diferenças imunológicas entre as éguas resistentes e suscetíveis (FUMUSO et al., 2003) e que a administração de um imunomodulador reduz essas diferenças (FUMUSO et al., 2007). Foi demonstrado, também, que a corticoterapia reduz a formação de óxido nítrico em diferentes tipos celulares (WALLERATH et al., 1999; WALKER et al., 1997; SHINODA et al., 2003).

A hipótese deste estudo é que a corticoterapia causa uma alteração no ambiente uterino da égua suscetível, previamente à cobertura, verificada através de modificações na composição protéica e na concentração de óxido nítrico no líquido endometrial e que estas modificações são responsáveis por uma melhora no desempenho reprodutivo.

O presente trabalho teve por objetivo verificar o efeito da corticoterapia sobre a proteômica e a concentração de óxido nítrico no líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite, na presença e na ausência de um processo infeccioso.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Inflamação

A inflamação é a resposta do organismo frente a uma agressão (ROBBINS et al., 1999), que corresponde a uma série complexa de reações (BAUMANN & GAULDIE, 1994). O próprio tecido lesado inicia a resposta (GRUYS et al., 2006), com aumento da permeabilidade vascular e migração das células de defesa, os leucócitos, e termina com a reparação do tecido lesado ou a formação de fibrose (CRANSHAW & GRIFFITHS, 2003). É um mecanismo de magnitude variável e essencial para a proteção do organismo (SANTOS JÚNIOR, 2003), pois controla e isola a lesão (ROBBINS et al., 1999), de modo que os componentes do sistema de defesa como as imunoglobulinas, o sistema complemento e os leucócitos atinjam o local da agressão (WHITE, 1999). Estes componentes de defesa são, normalmente, encontrados em baixas concentrações nos fluidos teciduais, em comparação as suas concentrações na circulação sanguínea. As imunoglobulinas não conseguem transpor a barreira endotelial por serem moléculas maiores e, dessa forma, os mecanismos da reação inflamatória facilitam a marginação desses fatores até a região afetada (WHITE, 1999).

O tecido lesionado libera substâncias de baixo peso molecular, que são os metabólitos do ácido aracdônico: as prostaglandinas ( $I_2$ ,  $E_2$ ,  $D_2$  e  $F_{2a}$ ), os tromboxanos e os leucotrienos (BAUMANN & GAULDIE, 1994), que são responsáveis pelas alterações iniciais do processo inflamatório. As prostaglandinas promovem a vasodilatação (BAUMANN & GAULDIE, 1994), com aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, agregação de plaquetas e a degranulação celular (WHITE, 1999). O tromboxano  $A_2$  é responsável pela vasoconstrição e os leucotrienos  $B_4$ ,  $C_4$ ,  $D_4$  e  $E_4$  pela quimiotaxia de células fagocitárias e contração da musculatura lisa (BAUMANN & GAULDIE, 1994). A reação inflamatória é classificada em aguda e crônica, de acordo com a severidade e duração (ROBBINS et al., 1999).

#### 2.1.1 Resposta inflamatória aguda

A inflamação aguda inicia imediatamente após a injúria e apresenta cinco características básicas: calor, tumor, rubor, dor e perda da função (ROBBINS et al., 1999). Ocorre uma dilatação dos vasos da região afetada, o que resulta em um aumento do fluxo sanguíneo para o local. Com isso, ocorre aumento da permeabilidade vascular (BAUMANN & GAULDIE, 1994), a qual faz com que extravase exudato para o tecido

agredido com a formação de edema (METCALFE et al., 1997). Juntamente, ocorre o aporte de leucócitos, dos quais os neutrófilos são os primeiros a transpor a parede vascular, devido à maior mobilidade no sangue. A taxa de mobilidade dos neutrófilos é de 7-11  $\mu$ /min (GALKIN et al., 1997), mas pode chegar a mais de 30  $\mu$ /min, nos casos de lesão tecidual (ZIGMOND, 1977).

A defesa inicial do organismo é chamada de resposta da fase aguda e ocorre em resposta a um estímulo como trauma, queimadura, infecção, cirurgia, neoplasias, desordens imunológicas ou qualquer dano tecidual em geral (GRUYS et al., 2006). A resposta da fase aguda é um evento fisiológico, dinâmico e complexo de reações, altamente organizado, visto logo após a exposição a um fator desencadeador (SUFFREDINI et al., 1999; PETERSEN et al., 2004; GRUYS et al., 2005a). Mudanças sistêmicas e metabólicas no organismo ocorrem na resposta aguda (SUFFREDINI et al., 1999), devido a distúrbios em sua homeostasia (GRUYS et al., 2006). Tais mudanças promovem uma defesa inicial não-específica contra o agressor, até que uma imunidade específica seja adquirida (SUFFREDINI et al., 1999). Normalmente, as alterações sistêmicas são distantes da agressão inicial e envolvem vários órgãos, todos programados para eliminar o antígeno agressor (CERÓN & PARRA, 2005). Adicionalmente às alterações sistêmicas, uma série de alterações pode ser observada no laboratório (GRUYS et al., 2006). Dentre os vários eventos que ocorrem como as ativações do sistema complemento, da migração de células inflamatórias e de imunoglobulinas, ocorrem também à liberação de citocinas e uma alteração na concentração de várias proteínas plasmáticas (MACKAY, 2000; PETERSEN et al., 2004).

#### 2.1.1.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de micro-organismos (LEE & GRINSTEIN, 2004). São células polifuncinais, caracterizadas por mobilidade e secreção. A ativação de neutrófilos está associada à geração de superóxidos e degranulação (GALKIN et al., 1997). A principal função dos neutrófilos é devido a sua capacidade em englobar patógenos, através da fagocitose (LEE & GRINSTEIN, 2004) e ao complexo armamentário que possuem para eliminar tais patógenos. Os neutrófilos estimulados geram uma rede de fibras extracelulares bactericidas, que se liga a bactérias gram-positivas e gram-negativas (BRINKMANN et al., 2004). Tais ferramentas antimicrobianas incluem a produção de radicais livres de

oxigênio, proteínas e enzimas líticas (LEE & GRINSTEIN, 2004), como a elastase (BRINKMANN et al., 2004), que danificam a membrana microbiana. Estas enzimas estão guardadas em grânulos, que se fundem com vacúolos fagocíticos, liberando o conteúdo (LEE & GRINSTEIN, 2004).

Os neutrófilos devem ser atraídos para o local da agressão, através de fatores quimiotáticos, aderirem à parede endotelial e atravessar o endotélio vascular (BAUMANN & GAULDIE, 1994). Para que os neutrófilos realizem a fagocitose, as moléculas estranhas precisam ser reconhecidas e para que sejam inativadas precisam fixar-se a receptores circulantes, que desencadeiam a resposta (BERLOT et al., 2007). Esta tarefa é realizada por dois sistemas distintos, mas que operam em conjunto: (COHEN, 2002; MEDZHITOV & JANEWAY, 2000) o sistema complemento e o sistema reticuloendotelial, que corresponde às células fagocitárias (BERLOT et al., 2007). O número de receptores presentes na superfície das células fagocitárias é determinado geneticamente e, apesar de suficiente, não pode atingir a ampla variedade de antígenos microbianos (BERLOT et al., 2007). Portanto, um sistema mais flexível é necessário para vencer todos os agentes e substâncias que entram em contato com o hospedeiro. Este mecanismo, conhecido como imunidade adquirida, devido a sua capacidade em adaptar-se aos antígenos em constante mudança, envolve os anticorpos (BERLOT et al., 2007).

#### 2.1.1.2 Imunoglobulinas

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, são secretados por plasmócitos, derivados de linfócitos B (BERLOT et al., 2007). Existem cinco classes de imunoglobulinas, as classes G, A, M, E e D. A classe IgG é considerada a de estrutura prototípica e consiste em uma molécula em forma de Y, constituída de duas cadeias de peptídeos idênticas, uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Ambas as cadeias reagem com o antígeno e ativam vários componentes do sistema imune desencadeando a resposta, que pode ser a fagocitose, a citotoxicidade mediada por anticorpo e a lise mediada por complemento. A IgG pode sofrer modificações conformacionais, de acordo com a variabilidade do antígeno (BERLOT et al., 2007).

As imunoglobulinas são transdutores bioquímicos capazes de reconhecer microorganismos invasores (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000) e opsonizar bactérias, que faz o reconhecimento pelas células fagocitárias (TOMLINSON, 1993) diretamente ou através da cascata de complemento e neutralizar toxinas bacterianas (MEDZHITOV &

JANEWAY, 2000). Algumas outras possíveis ações das imunoglobulinas são a modulação de citocinas, através da diminuição das pró-inflamatórias e do aumento das anti-inflamatórias e a modulação da cascata de complemento (WERDAN, 1999; WERDAN, 2001). A ativação do sistema complemento é chave para a amplificação da resposta imune (ANDOH et al., 1995).

### 2.1.1.3 Complemento

O sistema complemento promove uma defesa multifacetada contra as infecções. Depois de ativado, o complemento pode eliminar os micro-organismos, através da opsonização ou matar diretamente, através da lise dos invasores (TOMLINSON, 1993). Os produtos da ativação do sistema complemento também promovem uma resposta inflamatória e estão envolvidos na indução e modulação da resposta imune, que leva a produção dos anticorpos (TOMLINSON, 1993). O complemento interage com os anticorpos (MILETIC & FRANK, 1995), que desencadeiam a cascata de ativação do complemento. A fagocitose dependente de complemento é realizada pela interação do complemento com receptores presentes nas células fagocitárias. O principal ligante é o complemento C3b com o receptor CR1 (KRYCH et al., 1992).

O sistema complemento também possui a importante função de remover imunocomplexos da circulação e pode ligar-se a células apoptóticas, ajudando a eliminá-las do tecido. Se o complemento falha nesse aspecto, pode haver a indução de uma reação autoimune (CHEN et al., 2010). Na indução da inflamação, o sistema complemento ativa o endotélio, aumenta a permeabilidade vascular e induz a expressão de moléculas de adesão e citocinas e promove o recrutamento de células inflamatórias (CAVAZZANA et al., 2007).

O principal determinante da virulência dos patógenos é a presença de um polissacarídeo capsular, que confere resistência à fagocitose, possivelmente, por interferir na interação com o receptor (TOMLINSON, 1993). A fagocitose da maioria dos organismos encapsulados requer anticorpo e/ou complemento, que promovem a ligação e ingestão desses organismos (TOMLINSON, 1993). Os complementos C3b e C5a podem elicitar a síntese de algumas citocinas, que por sua vez aumentam a fagocitose dependente de complemento. A citocina Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pode neutralizar o efeito inibidor da cápsula de polissacarídeo, embora esse mecanismo não seja conhecido. Sugere-se que ocorra uma indução, por parte desta

citocina, de um aumento na expressão de receptores para complemento (COLLINS & BANCROFT, 1992).

#### 2.1.1.4 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é um radical livre gasoso (FREAN et al., 1997) de tamanho pequeno, 30 Da (SAXENA et al., 2000), que está envolvido na regulação de vários processos fisiológicos (FANG et al., 2007) e patológicos (RODEBERG et al., 1995). Esse gás é sintetizado por várias células mamíferas (RODEBERG et al., 1995), incluindo as inflamatórias como os macrófagos e neutrófilos (ALGHAMDI & TROEDSSON, 2002). A produção do óxido nítrico ocorre com a oxidação do aminoácido L-arginina (RODEBERG et al., 1995; STUEHR, 1999), através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A sintase NOS converte o terminal do grupo guanidina do L-arginina em óxido nítrico (RODEBERG et al., 1995). Existem três isoformas desta enzima, de acordo com a expressão em células específicas: a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS) por citocinas (ROBBINS et al., 1999), embora a expressão não seja limitada a essas localizações (DAFF, 2003). A iNOS, primeiramente descrita em macrófagos, é induzida por citocinas e endotoxinas e produz grandes quantidade de óxido nítrico, por horas (EKERHOVD et al., 2000).

O óxido nítrico, produzido e liberado no processo inflamatório, possui uma meia-vida bastante curta, de 3 a 5 segundos e é, rapidamente, neutralizado pela hemoglobina, azul de metileno e superóxidos (RODEBERG et al., 1995). Além da inflamação (EKERHOVD et al., 2000), outras funções fisiológicas do óxido nítrico no organismo mamífero estão a participação na defesa imune, na neurotransmissão, na coagulação (RODEBERG et al., 1995) e na mediação do tônus vascular (RODEBERG et al., 1995), causando o relaxamento da musculatura lisa (ALGHAMDI & TROEDSSON, 2002). Pensava-se que somente a acetilcolina era responsável pela vasodilatação (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Porém, a acetilcolina é apenas um dos agonistas que se liga a receptores presentes nas células endoteliais e libera uma substância difundível, denominada de fator relaxante derivado do endotélio (RODEBERG et al., 1995). Em alguns dos primeiros relatos do óxido nítrico, foi demonstrado que este gás mimetiza os efeitos do fator relaxante, pois ambos possuem a meia-vida de 3 a 5 segundos, são inibidos por anion superóxido e hemoglobina e aumentados pela enzima superóxido dismutase, sugerindo que eles são a mesma molécula responsável pela vasodilatação. (IGNARRO et al., 1987; PALMER et al.,

1987). O óxido nítrico é descrito como uma das principais moléculas de sinalização intra e intercelular (RODEBERG et al., 1995).

#### 2.1.1.5 Citocinas

As citocinas são mediadores inflamatórios produzidos por quase todas as células nucleadas. São secretadas, primeiramente, por macrófagos ativados ou em resposta a um dano local e então são lançadas na corrente sanguínea (WEBEL et al., 1997). Existem 18 citocinas, com a denominação de interleucinas (IL-). Algumas como o TNF- $\alpha$ , mantiveram a denominação biológica original (DINARELLO, 2000).

As citocinas agem juntas, através de caminhos múltiplos e concomitantes, passando da corrente sanguínea para vários órgãos-alvo. Possuem efeito local sobre as células ao redor da agressão adicionalmente a efeitos sistêmicos (SUFFREDINI et al., 1999). As citocinas são proteínas pequenas, não-estruturais, com peso molecular de 8 a 40 kDa (DINARELLO, 2000), que agem como mensageiros entre o local da agressão e os hepatócitos responsáveis pela síntese de proteínas inflamatórias (PETERSEN et al., 2004).

Algumas citocinas promovem a inflamação e são chamadas de pró-inflamatórias, enquanto que outras inibem a ação das últimas e são chamadas de anti-inflamatórias. As principais citocinas pró-inflamatórias são a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , devido à ocorrência nos locais da inflamação e a capacidade em induzir a resposta inflamatória (ELLURU et al., 2006). A IL-1 $\beta$  induz, principalmente, a IL-6, mas também a IL-8, TNF- $\alpha$  e a ela mesma (ELLURU et al., 2006). As IL-4, IL-10 e IL-13 são potentes anti-inflamatórias e inibem os genes das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- $\alpha$ . Os interferons (INF-)  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  possuem atividade antiviral e são ativadores de células T citotóxicas. O INF- $\gamma$  é considerado uma citocina pró-inflamatória, pois aumenta a atividade do TNF- $\alpha$  (DINARELLO, 2000). A IL-8 é quimioatrativa para neutrófilos (NEVES et al., 2005; ZERBE et al., 2003) e ativa a degranulação (DINARELLO, 2000). A IL-1 e TNF- $\alpha$  também induzem moléculas de adesão endoteliais, que são essenciais para a adesão de leucócitos à superfície endotelial, antes da migração para os tecidos.

Todas as citocinas estão em equilíbrio, que determinará o andamento da condição. Portanto, a suscetibilidade a doenças é determinada pelo equilíbrio da expressão dos efeitos das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (DINARELLO, 2000).



#### 2.1.1.6 Proteínas da fase aguda

As proteínas da fase aguda (APP) são uma família de, aproximadamente, 30 proteínas plasmáticas (BANKS et al., 1995) derivadas do fígado (HULTÉN et al., 1999). Um evento distinto da inflamação é o aumento na síntese hepática dessas proteínas, caracterizado por uma resposta aguda protéica (PETERSEN et al., 2004). Em resposta à infecção, essas proteínas são rapidamente liberadas na corrente sanguínea e suas concentrações plasmáticas variam em, pelo menos, 25% durante a inflamação (CRISMAN et al., 2008). As APP, cujas concentrações aumentam no processo inflamatório são chamadas de APP positivas. A regulação hepática destas proteínas está associada ao decréscimo da síntese de outras proteínas plasmáticas, as chamadas APP negativas (GRUYS et al., 2006). A produção local das APP por células de órgãos envolvidos está em progressivo avanço científico atualmente (CRISMAN et al., 2008).

Um primeiro desafio na medicina envolve a detecção e monitoramento da inflamação, pois o reconhecimento da inflamação tão logo ela inicia é essencial para desenvolver um tratamento eficaz. A inflamação que passa despercebida ou que não apresenta algum sinal clínico, resulta em infecção sub-clínica e prejudica o crescimento e o desempenho (CRISMAN et al., 2008). Por isso, a pesquisa por marcadores iniciais da presença de inflamação tem sido o foco da medicina veterinária (MURATA et al., 2004; GRUYS et al., 2005a) e humana (BLANCO et al., 2008; ZSILA, 2010). O valor diagnóstico das APP é obtido através da medição das alterações nas concentrações (CRISMAN et al., 2008) muito úteis, pois podem caracterizar a resposta inicial do hospedeiro (HODGSON, 2005), avaliar o *status* geral da saúde animal (HEEGAARD et al., 1998) e o período pós-operatório (DABROWSKI et al., 2009) e detectar a presença e a progressão de doenças infecciosas e determinar o prognóstico e o diagnóstico das doenças. A medição das APP pode, adicionalmente, monitorar a resposta do hospedeiro junto à terapia e pode ser indicadora de stress e reação vacinal em várias espécies animais, como equinos (ANDERSEN et al., 2005; MILLER et al., 2005; CRISMAN et al., 2008) caninos, felinos (CERÓN et al., 2005), suínos (CHAPINAL et al., 2005; LLAMAS et al., 2005), bovinos (BACH et al., 2005; SLOCOMBE & COLDITZ, 2005) e humanos (ZSILA, 2010). As APP são ferramentas mais úteis que as citocinas, pois as últimas desaparecem da circulação em poucas horas, enquanto que a concentração das APP permanece alterada por 48 horas, após qualquer estímulo (GRUYS et al., 2006).

A produção das APP pelos hepatócitos (BELL et al., 1998) inicia por estímulo das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (PETERSEN et al., 2004; NIELSEN et al., 2005),

produzidas no local da inflamação (BELL et al., 1998). Em todos os mamíferos, a regulação da expressão dos genes das APP é mediada por essas citocinas (LYOUMI et al., 1998). Em humanos, as proteínas haptoglobina, proteína C-reativa, amilóide sérica A,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida e complemento C3 são reguladas pelas citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  (BANKS et al., 1995; LYOUMI et al., 1998) ou por combinações dessas citocinas com a IL-6 e glicocorticóides. Outras como o fibrinogênio,  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina e  $\alpha_1$ -antitripsina são reguladas pela IL-6 e glicocorticóides (BANKS et al., 1995; LYOUMI et al., 1998). Porém, a IL-6 é a principal citocina que aparece envolvida na indução das APP, com contribuição das citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  (BANKS et al., 1995; CHARLES et al., 1999; MÜLLER et al., 2002). De forma semelhante, em ratos, o gene da  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida é induzido pelas IL-6, IL-1 e glicocorticóides, enquanto que o gene para  $\alpha_2$ -macroglobulina responde a IL-6 ou fator inibidor de leucemia e glicocorticóides (GABAY et al. 1996). Em bovinos, a haptoglobina é induzida pela IL-6 (YOUNG et al., 1995). Em equinos, a IL-6 é a principal citocina que estimula o fígado a produzir as APP (CRISMAN et al., 2008), mas também há a ação da IL-1 e TNF- $\alpha$  (HULTÉN et al., 2002). Porém, a combinação de citocinas pode ter efeito estimulador ou depressivo. Por exemplo, a proteína amilóide sérica A geralmente requer IL-6 e IL-1 ou TNF- $\alpha$ , enquanto que a IL-1 e TNF- $\alpha$  inibem a indução de fibrinogênio pela IL-6.

Os glicocorticóides possuem efeito regulador sobre a produção das APP pelas citocinas, enquanto que a insulina, por exemplo, é um hormônio que pode inibir a produção de algumas APP (GABAY & KUSHNER, 1999). Os glicocorticóides potencializam os efeitos das citocinas sobre o estímulo para a produção das APP (CRISMAN et al., 2008) sozinhos (BAUMANN et al., 1987) ou em sinergia com as citocinas (HERMOSO et al., 2004; PEREZ et al., 2005) (ver item 2.2, página 47).

A resposta protéica aguda é benéfica ao organismo, pois as APP são associadas a funções de defesa, desenvolvimento, alteração tecidual (GRUYS et al., 2005a) e restauração da homeostasia (CRISMAN et al., 2008). Dentre as funções estão ativação de complemento, opsonização de micro-organismos, remoção de restos celulares e radicais livres (GRUYS et al., 2006), coagulação, fibrinólise (GABAY & KUSHNER, 1999) e inibição de proteases neutrofílicas (BANKS et al., 1995; GRUYS et al., 2006). Por isso, a resposta aguda protéica é crítica para a inflamação e cicatrização e também possui ação anti-inflamatória, que atenua a inflamação (CRISMAN et al., 2008), quando necessário. A tabela 1 (página 35) demonstra as principais APP e suas funções mais importantes, envolvidas no processo inflamatório.

#### 2.1.1.6.1 Classificação das APP

A variação na concentração das APP positivas e negativas aparece em tempo variável, com o surgimento da resposta aguda (LYOUMI et al., 1998). Dentro das APP positivas, existe uma subclassificação, em positivas maiores e positivas moderadas (HULTÉN et al., 2002).

As APP positivas maiores apresentam as seguintes características: (a) concentrações baixas ou indetectáveis no plasma de indivíduos sadios; (b) suas concentrações aumentam, rapidamente, muito acima de 10 vezes na resposta aguda; (c) expressam uma variação dinâmica ampla; (d) decréscimo rápido na concentração com a resolução da doença e (e) infecções secundárias resultam em aumento na concentração (CRISMAN et al., 2008). As APP positivas moderadas apresentam as seguintes características: (a) estão sempre presentes no plasma de indivíduos saudáveis; (b) suas concentrações aumentam de 1 a 10 vezes no processo inflamatório e (c) a resposta é geralmente mais lenta, demora dias a semanas para aumentar, atingir o pico e voltar aos valores basais (CRISMAN et al., 2008).

As APP negativas estão, normalmente, presentes nos animais sadios, mas suas concentrações irão decrescer, em relação à resposta aguda (TOUSSAINT et al., 2005), porque o fígado necessita de aminoácidos para produzir as proteínas positivas e isso ocorre à custa das negativas (CRISMAN et al., 2008).

Nos equinos, a proteína amilóide sérica A é a única que preenche todos os critérios de positiva maior (CRISMAN et al., 2008; HULTÉN et al., 2002), chegando, algumas vezes, a aumentar até mil vezes a concentração, após dano tecidual (HULTÉN et al., 2002). As proteínas haptoglobina, fibrinogênio,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida e proteína C-reativa são consideradas positivas moderadas. Exemplos de APP negativas são albumina, apolipoproteína A-1, transtiretina e transferrina (GRUYS et al., 2006). A transferrina, no entanto, pode ser considerada uma APP positiva (THOMAS & SCHREIBER, 1989).

As APP são divididas em 6 frações, de acordo com o perfil sérico: albumina (que corresponde a 50% do total),  $\alpha_1$ -globulinas,  $\alpha_2$ -globulinas,  $\beta_1$ -globulinas,  $\beta_2$ -globulinas e  $\gamma$ -globulinas. Importantes  $\alpha$ -globulinas incluem antitripsina, ceruloplasmina, amilóide sérica A e haptoglobina (KANEKO, 1997). As  $\beta$ -globulinas incluem fibrinogênio (CERÓN et al., 2005), C3, C4, transferrina e proteína C-reativa e as  $\gamma$ -globulinas incluem as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM (KANEKO, 1997).

#### 2.1.1.6.2 $\alpha_1$ -antitripsina

A  $\alpha_1$ -antitripsina (AAT) é uma glicoproteína de 394 aminoácidos, com, aproximadamente, 52 kDa. É responsável por mais de 90% da capacidade inibitória de proteases presentes na circulação (TRAVIS & SALVESEN, 1983). A AAT pertence à família das serpinas (enzimas inibidoras de proteases) e dentre elas é a mais abundante encontrada no sangue (GETTINS, 2002). A sua principal função é neutralizar/inibir, através da formação de complexos, a atividade danosa das proteases, liberadas durante o processo inflamatório, pelas células de defesa do organismo, principalmente, pelos neutrófilos (CHURG et al., 2001; HADZIC et al., 2006). As principais proteases inibidas pela AAT são a tripsina, a proteinase 3 e a elastase, liberadas pelos neutrófilos (CRYSTAL, 1989; TRAVIS & SALVESEN, 1983). A AAT é, predominantemente, expressa por hepatócitos, mas também é sintetizada e secretada por macrófagos e células intestinais e epiteliais (ZSILA, 2010). Alterações em sua molécula podem comprometer sua atividade e reduzir a funcionalidade. Em humanos, existe uma doença genética, na qual as pessoas apresentam deficiência de AAT. Ocorre a expressão anormal desta proteína que tende a polimerizar, predispondo a doenças pulmonares e hepáticas. Ocorre deposição de AAT nos hepatócitos e diminuição de sua liberação na corrente sanguínea (BLANCO et al., 2008; LAURELL & ERIKSSON, 1963; HADZIC et al., 2006). Há anos, foi observado que fragmentos de colágeno e elastina (produzidos por ação proteolítica) eram quimioatrativos (SENIOR et al., 1980; SENIOR et al., 1989). Foi esta observação que sugeriu que o complexo antiprotease e seu substrato agem, não só impedindo diretamente a ação proteolítica, mas também prevenindo o influxo de células inflamatórias por impedirem a formação de fatores quimiotáticos (CHURG et al., 2001). Independentemente de sua ação inibidora de proteases, a AAT está implicada no processo inflamatório e defesa do hospedeiro. Ela é uma APP positiva, cuja função é muito importante, pois além da defesa, ajuda a restaurar a homeostase do organismo hospedeiro (TILG et al., 1993). No trabalho realizado *in vitro* por Hadzic et al. (2006) foi observado que a AAT inibiu a proliferação de células B e a liberação de IL-6.

Estudos com modelos em camundongos demonstraram o efeito anti-inflamatório da AAT, como diminuição do infiltrado celular (CHURG et al., 2001; LEWIS et al., 2005; NITA et al., 2005), da expressão de mediadores pró-inflamatórios (LEWIS et al., 2005) e quimiotáticos (CHURG et al., 2001; NITA et al., 2005) e liberação de outros componentes inflamatórios, como óxido nítrico e moléculas de superfície de

histocompatibilidade classe (MHC-) II (LEWIS et al., 2005). O tratamento adjunto com AAT é benéfico para pacientes submetidos a transplantes, que permanecem intactos, até a produção de anticorpos contra AAT (LEWIS et al., 2005). A terapia acima de 30 dias com AAT induz uma imunotolerância específica (células T reguladoras) aos transplantes (LEWIS et al., 2008) e aumento nos níveis de IL-10 e antagonista de receptores para IL-1 (IL-1Ra) e diminuição na expressão de mediadores pró-inflamatórios. A AAT também apresenta atividade antibacteriana, através da ligação com proteínas enteropatogênicas como as secretadas pela bactéria *Escherichia coli* e reduz, consideravelmente, a hemólise mediada por elas (KNAPPTEIN et al., 2004) e a letabilidade de endotoxinas bacterianas (JIE et al., 2003) e do TNF- $\alpha$  (LIBERT et al., 1996).

Em cavalos, a AAT pode ser utilizada como marcador de sobrecarga de treino, pois ela é, provavelmente, liberada para proteger o tecido muscular, uma vez que sua concentração aumenta em cavalos submetidos a exercício excessivo, mas não após treino normal (BOUWMAN et al., 2010).

#### 2.1.1.6.3 Amilóide A sérica

Amilóide A sérica (SAA) é uma das principais proteínas positivas maiores da resposta aguda (ECKERSALL, 2004; HEEGAARD et al., 2005; SELLAR & WHITEHEAD, 1993), em várias espécies animais, como bovinos (HUMBLET et al., 2005), ovinos (WINTER et al., 2005), felinos (PALTRINIERI, 2005) e equinos (ANDERSEN et al., 2005; CRISMAN et al., 2008; HULTÉN et al., 1999). A SAA é o maior marcador inflamatório tanto em potros, quanto em cavalos adultos (HULTÉN et al., 1999). A SAA é um precursor da proteína amilóide A (AA), uma proteína depositada em vários órgãos, na amiloidose secundária. A SAA é uma proteína pequena, de 15 kDa (CERÓN et al., 2005), sintetizada por hepatócitos e também pelas células epiteliais mamárias, quando estimuladas pela produção de citocinas pró-inflamatórias (BERRY et al., 2005). É uma apolipoproteína hidrofóbica, que forma um complexo com lipoproteínas de alta densidade (CERÓN et al., 2005), como o HDL.

A SAA aumenta mais de 100 vezes, rapidamente, após injúria, inflamação ou infecção (HULTÉN et al., 1999). Ela pode ser utilizada como marcador de inflamação e infecção local (BERRY et al., 2005) ou sistêmica (ANDERSEN et al., 2005). Dessa forma, sua utilização é muito útil para diagnosticar enfermidades em estágios iniciais e infecções subclínicas (PETERSEN et al., 2005), pois apesar de a resposta neutrofílica

inicial ocorrer antes do aumento da proteína, normalmente, não é mensurável em curto tempo. Por isso, a SAA é utilizada para detectar o status sanitário em diversas situações e condições clínicas, como inflamação fisiológica pós-parto (HUMBLET et al., 2005), mastite (WINTER et al., 2005) e reações vacinais (ANDERSEN et al., 2005).

#### 2.1.1.6.4 Proteína C-reativa

A proteína C-reativa (CRP) é uma APP positiva (PARRA et al., 2005; SØRENSEN et al., 2005), muito utilizada para monitorar doenças infecciosas e inflamatórias (HULTÉN et al., 1999). No soro humano, a CRP pode aumentar até 1000 vezes após um estímulo, embora algumas vezes fosse observado um aumento moderado (BELL et al., 1998). Em animais, a CRP também é muito utilizada para detectar e monitorar diversas doenças, como linfomas em cães (MISCHKE & ECKERSALL, 2005), onde a concentração de CRP aumenta significativamente. Em porcos, a CRP aumenta moderadamente e atinge o pico em até 8 dias após infecção bacteriana (SØRENSEN et al., 2005). Em cavalos, a CRP não é uma das principais APP, sua cinética é semelhante ao fibrinogênio (YAMASHITA et al., 1991), que apresenta uma concentração alta em animais sadios e uma resposta tardia e limitada após estímulos, com aumento moderado de 2 a 4 vezes o valor normal e picos de 4 a 6 dias, apresentando um declínio lento, na fase de recuperação.

#### 2.1.1.6.5 Haptoglobina

A haptoglobina (Hp) é uma APP positiva (HEEGAARD et al., 1998; PETERSEN et al., 2004; PALLARÉS et al., 2008), cujo aumento da concentração é considerado indicativo de inflamação grave (FÜERLL et al., 2005).

A Hp é uma glicoproteína (YOUNG et al., 1995), primariamente produzida pelos hepatócitos, cuja síntese é estimulada pela concentração de hemoglobina (Hb) livre no plasma (CRISMAN et al., 2008). Várias atividades biológicas da Hp foram descritas, tais como: ação bacteriostática, estímulo da angiogênese, papel no metabolismo lipídico, efeito imunomodulador e inibição da atividade neutrofílica respiratória (PETERSEN et al., 2004). Porém, a principal e mais conhecida ação da Hp é prevenir a perda de ferro, através da formação de um complexo estável, a ligação com a Hb no sangue (PETERSEN et al., 2004). A Hp liga-se à Hb livre, liberada pela hemólise (HEEGAARD et al., 1998), que além de evitar a perda de ferro pelos rins, evita a nefrotoxicidade causada pela Hb, que é pró-inflamatória (CERÓN et al., 2005).

Até que a capacidade de ligação da Hb esteja saturada, não há excreção renal de Hb. O complexo Hp-Hb é rapidamente removido da circulação, através do sistema retículoendotelial (YOUNG et al., 1995). Devido a isso, a ação bacteriostática da Hp, provavelmente, deve-se à limitação da disponibilidade de hemoferro para o crescimento bacteriano (TAIRA et al., 1992a). Em humanos, a Hp inibe o crescimento de *Streptococcus pyogenes in vitro* (DELANGÉ et al., 1998) e em bovinos foi sugerido efeito imunomodulador (MURATA & MIYAMOTO, 1993), devido à inibição da blastogênese de linfócitos *in vitro*. O efeito anti-inflamatório de Hp pode ser considerado devido à proteção dos tecidos contra os danos causados por espécies reativas de oxigênio e através da inibição da quimiotaxia de granulócitos e da fagocitose (CERÓN et al., 2005; CRISMAN et al., 2008). A Hp aumenta a proteção contra infecção bacteriana, possivelmente modificando a resposta inflamatória, através de influência sobre o tráfego de células e liberação de mediadores (HODGSON, 2005).

Embora, tenham sido observados aumentos de 50 a 100 vezes em bovinos (YOUNG et al., 1995), camundongos (GODSON et al., 1996) e porcos (HODGSON, 2005; SØRENSEN et al., 2005) a Hp é considerada uma APP moderada (HULTÉN et al., 2002), chegando a demorar até semanas para diminuir sua concentração (HEEGAARD et al., 1998; SØRENSEN et al., 2005) e retornar aos valores basais (CRISMAN et al. 2008; POLLOCK et al., 2005). Por isso, esta proteína pode ser indicativa de infecções crônicas (HODGSON, 2005). É muito utilizada como indicadora do *status* sanitário em diversas enfermidades e situações clínicas, como linfomas (CALAZANS et al., 2009), septicemia (HODGSON, 2005), leucemia (MISCHKE & ECKERSALL, 2005), doenças virais (CARPINTERO et al., 2005a), stress (SLOCOMBE & COLDITZ, 2005), cirurgia (KENT & GOODALL, 1991), artrite não-infecciosa (HULTÉN et al., 2002), administração de adjuvante de Freund (MILLS et al., 1998) e laminite induzida por carboidratos (FAGLIARI et al., 1998). Embora moderada, a Hp pode ser considerada mais sensível que o fibrinogênio ao indicar o *status* clínico de cavalos sadios e em diferentes enfermidades (OUKACHA et al., 2005). Nos animais sadios, os valores mais altos são observados em potros recém-nascidos (até 12 meses de idade), a partir dos 18 meses tende a decrescer e aos 21 anos está com os níveis mais baixos (TAIRA et al., 1992a). Em éguas prenhes, ocorre aumento um mês antes do parto, depois decresce e atinge valores mínimos em 3 meses após o parto (TAIRA et al., 1992a). Em potros com enterite, pneumonia e diarreia e em adultos com pneumonia, cólica e febre dos transportes e em aqueles com inflamação induzida experimentalmente

é observado aumento significativo na concentração sérica de Hp, com picos entre 2 e 5 dias (TAIRA et al., 1992a).

#### 2.1.1.6.6 $\alpha$ 1-glicoproteína ácida

A  $\alpha$ <sub>1</sub>-glicoproteína ácida (AGP) é uma proteína plasmática positiva moderada produzida pelo fígado (SMITH, 2005), que aumenta de 2 a 5 vezes na resposta aguda (CUNNINGHAM et al., 2005). Possui atividades biológicas como imunomoduladora e anti-inflamatória (CECILIANI et al., 2005; STAKAUSKAS et al., 2005) e atua como uma proteína de transporte plasmático; atividades, aparentemente, distintas (CECILIANI et al., 2005). A AGP possui a capacidade de ligar-se e de carrear várias drogas lipofílicas, neutras e básicas, de origem endógena (hormônios esteróides) e exógena. A AGP é descrita como uma inibidora potente das funções dos neutrófilos, como quimiotaxia e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos humanos. Porém, em bovinos o mesmo não foi observado (STAKAUSKAS et al., 2005). A AGP canina foi purificada e caracterizada bioquimicamente e como em humanos, foi descrita como uma proteína incomum de 43 kDa e com alto teor de carboidratos de 45% (FOURNIER et al., 2000).

Durante várias condições fisiológicas e patológicas, a concentração de AGP aumenta e tem se demonstrado um indicador inicial de alterações, distúrbios da homeostasia ou histórico de doenças; uma vez que, isso ocorre antes da produção de anticorpos pelo sistema imune, ou antes, que os sinais clínicos apareçam. Os níveis da AGP também são valiosos para o prognóstico e monitoramento de tratamentos e, particularmente, úteis como marcadores para a detecção de doenças no estágio inicial, da extensão e progressão da doença e acessar a eficácia de tratamentos ou de alterações relacionadas, na tentativa de melhorar o manejo ou o meio ambiente (SMITH, 2005). Aumentos na concentração de AGP foram observados em diversas situações em felinos (PALTRINIERI, 2005), bovinos (CECILIANI et al., 2005; HODGSON et al., 2005) e búfalos (HODGSON et al., 2005). A glândula mamária bovina possui o gene para expressão de AGP, uma que vez foi detectado RNA mensageiro (mRNA) do gene AGP no tecido mamário (CECILIANI et al., 2005). A presença de AGP no leite deve indicar um papel desta proteína no processo inflamatório, incluindo a modulação de reações indesejáveis que ocorrem na mastite e, também, deve contribuir para com a complexa rede de moléculas imunoreguladoras expressas no colostro (CECILIANI et al., 2005). Em equinos, a AGP não tem sido muito estudada. No entanto, Taira et al. (1992b)



relataram que ela aumenta de 2-3 dias após cirurgias em potros e cavalos adultos e volta aos valores normais 14-28 dias depois.

#### 2.1.1.6.7 Fibrinogênio

O fibrinogênio (Fb) foi umas primeiras APP a ser reconhecida. O Fb é uma glicoproteína plasmática solúvel, também sintetizada pelo fígado. É considerado uma APP moderada, com aumento de 1 a 10 vezes, em 24 a 72 horas, após indução de inflamação. A referência da concentração em cavalos saudáveis é 200 a 400 mg/dL (CRISMAN et al., 2008), mas o tempo de resposta, após um estímulo inflamatório fez com que o Fb tenha sido considerado uma APP de pouca sensibilidade (CRISMAN et al., 2008). Várias funções foram atribuídas ao Fb, promove o substrato para formação de fibrina na reparação tecidual e para migração de células inflamatórias. O Fb liga-se a superfície de fagócitos, iniciando uma cascata de sinais intracelulares, que promove a degranulação, fagocitose e citotoxicidade dependente de anticorpo (CRISMAN et al., 2008). Nas últimas décadas, o Fb foi muito utilizado como diagnóstico e para monitorar a inflamação em cavalos (HULTÉN et al., 2002) e por ser de baixo custo e relativamente fácil, provavelmente, continuará a ser muito utilizado. Porém, atualmente, o Fb sozinho não pode ser utilizado como indicativo de inflamação (CRISMAN et al., 2008).

#### 2.1.1.6.8 Ceruloplasmina

A ceruloplasmina (Cp) é uma glicoproteína, possui peso molecular de, aproximadamente, 151 kDa. Contém 0,34% de cobre, que corresponde a 8 átomos de cobre por molécula. A Cp transporta o cobre, utilizado na reparação tecidual, formação de colágeno e protege as células e tecidos contra agentes oxidantes produzidos pelas células fagocitárias e elimina debris celulares (CERÓN et al., 2005). A Cp aparece aumentada em cães com linfoma (CALAZANS et al., 2009), mas a sua aplicação para diagnóstico permanece menos comum que as outras APP (MURATA et al., 2004).

#### 2.1.1.6.9 Transferrina

As transferrinas são as principais reguladoras de ferro nos vertebrados. Também são encontradas em invertebrados e bactérias (AISEN, 1988). São todas glicoproteínas (AISEN & LISTOWSKY, 1980) e consistem em uma cadeia única de polipeptídeos de, aproximadamente, 680 aminoácidos (BOWMAN et al., 1988) e peso molecular entre

76-81kDa (AISEN & LISTOWSKY, 1980). As transferrinas mais representativas nos vertebrados são a transferrina sérica (TF) e a lactoferrina nos mamíferos e a ovotransferrina nas aves (AISEN, 1988). O ponto isoelétrico da TF e da ovotransferrina é levemente ácido (FEENEY & KOMATSU, 1966), enquanto que o da lactoferrina é muito básico (KINKADE et al., 1976).

A TF é uma APP negativa (MURATA et al., 2004), mas existem contradições quanto a sua classificação em positiva (THOMAS & SCHREIBER, 1989) ou negativa (TOUSSAINT et al., 2005). A TF é, primariamente, produzida no fígado e mais conhecida pela sua função de transporte e armazenamento de ferro (AISEN & LISTOWSKY, 1980; FORESTA et al., 1986; BRIGGS et al., 1999). A TF liga-se ao ferro forte o suficiente para não formar um produto hidrolítico insolúvel e, no entanto reversível para que o metal esteja disponível, de acordo com a demanda celular (AISEN & LISTOWSKY, 1980).

O ferro é um dos elementos essenciais à vida, de extrema importância, pois participa de várias reações bioquímicas no organismo. Incluindo transporte e estoque de oxigênio, transporte de elétrons, metabolismo de nitrogênio (N<sub>2</sub>) e hidrogênio (H<sub>2</sub>) molecular, decomposição ou utilização de derivados nocivos de oxigênio – como peróxido e superóxido – redução de ribotídeos à desoxiribotídeos (precursores de DNA) e ligação de oxigênio pela Hb e mioglobina (AISEN & LISTOWSKY, 1980). A vida sem ferro é impossível (NEILANDS, 1972), pois nenhuma célula viva poderia existir, sem o transporte específico de ferro, através de sua membrana (SHANZER et al., 1992). Durante episódios de invasão microbiana, o hospedeiro intensifica seus esforços para retirar ferro do invasor, os quais incluem: remoção de ferro do plasma e armazenamento nos hepatócitos, a absorção intestinal de ferro diminui e os leucócitos migram para o local da inflamação e secretam a proteína TF (WEINBERG, 1977). Devido a sua propriedade em sequestrar ferro (RATH, 2005), as transferrinas estão envolvidas na imunidade inata (TOUSSAINT et al., 2005), através de uma ação bacteriostática (DE JONG et al., 1990). Esta pode ser a função biológica da lactoferrina no leite (ARNOLD et al., 1977) e da ovotransferrina no desenvolvimento do embrião aviário (FEENEY & KOMATSU, 1966). Este fenômeno é chamado de “imunidade nutricional”, uma tentativa dos hospedeiros vertebrados de privar os microorganismos de ferro, essencial para o seu crescimento (WEINBERG, 1977).

A transferrina também possui efeito bactericida, protegendo diretamente contra infecção microbiana, quando ela não está saturada de ferro (ARNOLD et al., 1980), pois

a atividade antimicrobiana é neutralizada, especificamente, pelo excesso de ferro (WEINBERG, 1977; LASSITER et al., 1987). A enzima livre de ferro pode ligar-se a superfície da bactéria, enquanto que a saturada de ferro não e assim não consegue matar as bactérias (LASSITER et al., 1987). Uma das explicações para a atividade bactericida da TF pode ser através da produção de radicais hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ), a partir de superóxidos e peróxidos (McCORD & DAY, 1978; LASSITER et al. 1987). Adicionalmente, a TF pode ser imunomoduladora, através da regulação de outros sistemas de defesa, como a da produção de IL-6, óxido nítrico e metaloproteinase (RATH, 2005) e podem estar implicadas no crescimento e diferenciação celular (DE JONG et al., 1990). Foram descobertos, anteriormente, vários locais extra-hepáticos de produção de TF como cérebro (TU et al., 1991), músculo, medula óssea, glândulas salivares, baço, linfonodos, placenta, coração, pulmão (ALDRED et al., 1987) e testículo pelas células de Sertoli (FORESTA et al., 1986). Os fluídos e tecidos, que são expostos a invasão de micro-organismos, como clara do ovo, leite, plasma, leucócitos, lágrima e secreções genitais, são ricos em TF (WEINBERG, 1977). A secreção em grande quantidade de TF no plasma seminal (FORESTA et al., 1986) pode servir para inibir a geração de radicais reativos (BRIGGS et al., 1999) e atuar como fator de crescimento (WEINBERG, 1977).

#### 2.1.1.6.10 Transtiretina

A transtiretina (TT) é uma proteína negativa da fase aguda da inflamação. Sua concentração cai devido à diminuição na síntese hepática durante inflamação, infecção ou trauma (CAMPBELL et al., 2005). A TT possui um papel muito importante no transporte de retinol (vitamina A) na circulação. Ela forma um complexo com a proteína de ligação ao retinol (RBP) (CAMPBELL et al., 2005), uma proteína pequena de baixo peso molecular (21 kDa), a qual é a proteína exclusiva de transporte de retinol no organismo. A síntese e secreção de RBP por hepatócitos são, principalmente, controlados pela concentração de retinol. A formação do complexo de TT-RBP parece ser necessária para prevenir a perda excessiva da RBP, através de filtração glomerular. Além de seu papel em facilitar o transporte de retinol, a TT é uma das três maiores proteínas de ligação a tiroxina 4 (T4) (TOUSSAINT et al., 2005). A determinação na concentração de TT é usada como indicador de sanidade do animal (CAMPBELL et al., 2005).

#### 2.1.1.6.11 Apolipoproteína A-1

A Apolipoproteína A-1 (ApoA-1) é a principal  $\alpha$ -lipoproteína integrante do colesterol de alta densidade, o HDL (BRESNIHAN et al., 2004). O HDL evita a oxidação do colesterol de baixa densidade (LDL), cujos produtos resultantes da oxidação são altamente pró-inflamatórios (NAVAB et al., 2000; NAVAB et al., 2001). A ApoA-1, juntamente com enzimas anti-oxidantes, possui papel na determinação das propriedades anti-inflamatórias do HDL (NAVAB et al., 2001). Foi demonstrada a capacidade da ApoA-1 em inibir a ativação de monócitos e a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (HYKA et al., 2001). A ApoA-1 é, normalmente, considerada uma APP negativa, diminuindo rapidamente a valores mínimos, após infecção (CARPINTERO et al., 2005b; SØRENSEN et al., 2005). No entanto, sua presença é abundante em casos de artrite, levando a conclusão de que o aumento de ApoA-1 nos tecidos inflamados pode representar um mecanismo fisiológico para limitar a produção local de citocinas pró-inflamatórias (BRESNIHAN et al., 2004). O tratamento com ApoA-1 reduziu sinais de artrite e de IL-1 $\beta$  (CHARLES-SCHOEMAN et al., 2008). Adicionalmente, as lipoproteínas podem inibir a ligação do complemento em membranas-alvo (TOUSSAINT et al., 2005).

#### 2.1.1.6.12 Albumina

A albumina (Alb) é a proteína extracelular mais abundante do sangue (SHAMAY et al., 2005). É um polipeptídeo com 585 aminoácidos e peso molecular de, aproximadamente, 66 kDa (SHAMAY et al., 2005; TOUSSAINT et al., 2005). A Alb é sintetizada no fígado a uma taxa de 9 a 12 g/dia, sem reserva e estoque e é catabolizada na mesma taxa em que é produzida, por células adjacentes ao endotélio vascular. Embora, a expressão não-hepática de Alb tenha sido descrita em outros tecidos, como músculo esquelético de camundongos (WAGATSUMA et al., 2002), células epiteliais ovarianas humana (VARRICCHIO & STROMBERG, 1994) e células traqueais bovina (JACQUOT et al., 1988).

A Alb é a maior proteína plasmática, responsável por se ligar e transportar várias moléculas biológicas ativas (PETERS, 1985; ALAVI-SHOUSHTARI et al., 2006). É geralmente aceita como uma APP negativa (CERÓN & PARRA, 2005), mas os níveis diminuídos de Alb, também podem estar associados à deficiência nutricional. Uma diminuição no apetite é comumente visto em animais que estão sob processo inflamatório agudo. Essa diminuição será resultado da combinação da reação aguda

propriamente dita e de escassez alimentar (TOUSSAINT et al., 2005). No entanto, há resultados discordantes. Segundo alguns autores, a concentração de Alb no leite aumentou durante a transição da lactação para involução e da involução para lactogênese (SORDILLO et al., 1987) e durante a inflamação (WATANABE et al., 2000). Segundo Bounous (2000), durante esses períodos a Alb deve aumentar a defesa imune da glândula. No estudo de Shamay et al. (2005), foi verificado que a glândula mamária sintetiza Alb e que, em vacas com mastite, a expressão de mRNA de Alb é quatro vezes maior que em vacas sadias. Os autores concluíram que a expressão e secreção de Alb pela glândula mamária fazem parte do sistema de defesa não-específico inato e que são influenciadas pelo *status* sanitário do tecido e por hormônios.

Em éguas sadias, Tunón et al. (1998) observaram 56% mais Alb no líquido uterino do que no soro das mesmas éguas. Na secreção uterina de éguas com metrite crônica, Widders et al. (1984) observaram que a concentração de Alb aumentou, sugerindo síntese local ou transporte ativo de imunoglobulinas do soro para o útero.

Tabela 1 – Resumo das principais APP e seu envolvimento no processo inflamatório.

<b>Sigla</b>	<b>Função</b>	<b>Referência</b>
AAT	Principal inibidora de proteases (elastase e tripsina).	Suffredini et al. (1999)
AGP	Transporte de proteínas e ligação a esteróides. Atividade anti-neutrófilos e complemento. Aumenta secreção de IL-1Ra.	Cerón et al. (2005) Suffredini et al. (1999)
ApoA-1	Principal lipoproteína componente do HDL. Anti-inflamatória (previne oxidação do LDL, inibe a ativação de monócitos, IL1- $\beta$ e TNF- $\alpha$ ).	Hyka et al. (2001) Navab et al. (2000) Navab et al. (2001)
Cp	Antioxidante. Papel na cicatrização e transporte de cobre.	Cerón et al. (2005)
CRP	Opsonização, ativação de complemento, indução de citocinas e imunomodulação (inibição quimiotaxia e função neutrófilos).	Cerón et al. (2005) Suffredini et al. (1999)
Fb	Formação de fibrina. Promove a degranulação, fagocitose e citotoxicidade dependente de anticorpo.	Crisman et al. (2008) Suffredini et al. (1999)
Hp	Removedora de hemoglobina. Limita a disponibilidade de ferro. Bacteriostática, imunomoduladora. Inibe a quimiotaxia e fagocitose.	Delange et al. (1998) Murata & Miyamoto (1993) Suffredini et al. (1999)
SAA	Ativação de leucócitos, quimiotaxia e fagocitose. Inibição da liberação de peroxidase e linfócitos. Antioxidante.	Cerón et al. (2005) Linke et al. (1991) Suffredini et al. (1999)
TF	Transporte e limitação de ferro. Ação bacteriostática e bactericida.	De Jong et al. (1990) Suffredini et al. (1999)

### 2.1.1.7 Actina

A actina não é considerada propriamente uma APP, mas é o principal componente do citoesqueleto celular (HOSIE et al., 2008), presente em todas as células eucariotas (VAN TROYS et al., 1999). Esta proteína é central para o desempenho das funções básicas das células (HOSIE et al., 2008), como: contração muscular, citocinese, fagocitose, migração celular, organização e transporte intracelular e morfologia celular (VAN TROYS et al., 1999). O citoesqueleto intacto é imprescindível para a motilidade e ativação celular (DE CLERCK et al., 1997). A migração celular é iniciada quando os fatores quimiotáticos interagem com receptores plasmáticos de membrana, desencadeando a reorganização do citoesqueleto e modificações no formato celular. A formação e despolarização dos microfilamentos de actina são cruciais para a motilidade celular. Os microfilamentos são fitas de actina filamentososa/polimerizada (F-actina) e polímeros lineares de actina globular (G-actina), que estão em um fluxo contínuo de arranjo e desarranjo (ROGERS, 1992).

A actina possui a capacidade exclusiva de auto-organização (YATES-SIILATA et al., 2004), ou seja, de mudar, rapidamente, entre as formas G-actina e F-actina (DE CLERCK et al., 1997). A remodelação da actina é necessária para a movimentação dos neutrófilos, porque a inibição da polimerização da actina bloqueia, completamente, a quimiotaxia. Devido à rápida reorganização da actina, os neutrófilos são capazes de orientar a sua migração e exibir movimento quimiotático, que facilita sua acumulação nos locais da injúria (ZIGMOND, 1977). A degranulação e a produção de superóxidos também são controladas pela formação de filamentos de actina (BENGTSSON et al., 1991). Foi demonstrado que a proteína CRP aumenta o conteúdo de F-actina nos neutrófilos e, simultaneamente, diminui o conteúdo de G-actina (YATES-SIILATA et al., 2004). Há evidências recentes de que o rearranjo da actina pode ser chave, durante a regulação da resposta inflamatória, através da diminuição na produção de óxido nítrico, liberação de prostaglandina  $E_2$  e secreção de TNF- $\alpha$  (KIM et al., 2010). Adicionalmente, foi relatado que a actina modula a expressão de genes inflamatórios e potencializa a produção das enzimas iNOS e ciclooxigenase (COX)-2 (MALYSHEV & SHNYRA, 2003; QURESHI et al., 2005).

Como componente principal do citoesqueleto celular, a actina é liberada pelas células epiteliais, endoteliais e musculares danificadas, após injúria. Devido a isso, a actina, juntamente com as citocinas pode, também, servir como marcador para a predição de doenças, após injúria, isquemia e inflamação (KWON et al., 2003).

### 2.1.2 Endometrite

Na égua sadia, o útero é protegido por barreiras físicas, que são a vulva (CASLICK, 1937), o vestíbulo, a vagina e a cérvix (KATILA, 1996; TROEDSSON, 1999; LEBLANC, 2003b). Essas barreiras impedem a entrada de contaminantes no útero. Alterações nesses sistemas de defesa podem predispor a enfermidades. Apesar de a fertilidade variar entre éguas, devido ao manejo e tempo de cobertura incorreta, a endometrite é a principal causa dos baixos índices de prenhez (WATSON, 2000) e é considerada a terceira enfermidade mais importante na prática equina, após a cólica e distúrbios respiratórios (TROEDSSON, 1999).

De acordo com a etiologia e fisiopatologia, a endometrite pode ser classificada em 4 categorias: (1) transmitida por doenças infecciosas, (2) endometrite infecciosa crônica, (3) endometrite persistente induzida pela cobertura e (4) endometrite degenerativa crônica (endometrose) (TROEDSSON, 1999). A forma mais comum de endometrite, dentre essas 4 categorias é a causada pela cobertura (ALGHAMDI et al., 2005). Porém, em um primeiro momento, esta endometrite é considerada uma reação fisiológica, temporária (HUGHES & LOY, 1969; PETERSON et al., 1969; ZENT et al., 1998) e necessária, que serve para eliminar o excesso de espermatozóides, os espermatozóides mortos, plasma seminal, diluentes (no caso da inseminação artificial), bactérias e outros contaminantes, como debris celulares (LEBLANC et al., 1998; ZENT et al., 1998; TROEDSSON, 1999) do trato reprodutivo da égua e preparar o útero para a prenhez (ALGHAMDI et al., 2005).

Na égua, seja por monta natural (TROEDSSON, 1999) ou inseminação artificial (PALM et al., 2008), a deposição intrauterina de material exógeno provoca uma reação inflamatória fisiológica. Na monta natural, além do sêmen, há a introdução de bactérias (TROEDSSON, 2006), que estão presentes na genitália externa dos animais e na inseminação artificial, há a introdução de diluentes de sêmen (PALM et al., 2008). Esta reação inflamatória é comumente vista a partir de 0,5 a 1 hora, após a cobertura (KATILA, 1996). Ocorre um influxo de polimorfonucleares (PMNs) para o lúmen uterino e sua atividade fagocítica, após a opsonização do alvo (KATILA, 1996; TROEDSSON, 1999) é seguida de contração do miométrio, que é regulada pela prostaglandina  $F_{2\alpha}$  e oxitocina (TROEDSSON, 1999). Após a inseminação artificial, neutrófilos são vistos no útero em 2 e 4 horas (FIALA et al., 2007), com pico no mecanismo de defesa entre 6 e 12 horas (KATILA, 1996) e diminuição em 24 horas (FIALA et al., 2007). Na égua normal, a maioria dos produtos inflamatórios é eliminada

em até 48 horas, após a cobertura (KATILA, 1996). Porém, algumas vezes, a reação inflamatória continua, deixando de ser fisiológica e torna-se patológica, caracterizada pela persistência da inflamação (TROEDSSON, 2006). Esta condição patológica é denominada de endometrite persistente pós-cobertura (ZENT et al., 1998).

#### 2.1.2.1 Endometrite persistente pós-cobertura

A endometrite persistente pós-cobertura é a maior causadora de falhas de concepção vistas na fêmea equina (GUTJAHR et al., 2000). A suscetibilidade atinge 15% de éguas puro sangue de corrida (ZENT et al., 1998) e a taxa de morte embrionária é três vezes maior nas éguas que apresentam essa condição (MALSCHITZKY et al., 2003a). As éguas são classificadas como suscetíveis ou resistentes à endometrite, de acordo com a resposta uterina à inflamação. Enquanto que, a maioria das éguas elimina o excesso de espermatozóides e produtos da inflamação em menos de dois dias (éguas resistentes), uma população de éguas falham em fazê-lo, espontaneamente, por mais de quatro dias (éguas suscetíveis) (ALGHAMDI et al., 2005). Se a endometrite persiste por mais de 5 a 6 dias, quando o embrião descende do oviduto (ZENT et al., 1998), o ambiente uterino citotóxico não será compatível com a prenhez (WATSON, 2000).

Normalmente, esta doença é mais comumente vista em éguas multíparas do que em nulíparas (PETERSON et al., 1969). Isso porque éguas mais velhas (LEBLANC et al., 1998) e multíparas (CADARIO et al., 1999; HURTGEN, 2006), geralmente, apresentam problemas na anatomia reprodutiva, histórico de acúmulo de líquido (PYCOCK, 2006) e baixos índices de fertilidade (ZENT et al., 1998). Entretanto, a idade média das éguas normais (14 anos) e das éguas suscetíveis (16 anos) (VERONESI et al., 2006) não difere, significativamente (GHASEMZADEH-NAVA et al., 2004). Rigby et al. (2001) também sugeriram que a disfunção miometral das éguas suscetíveis à endometrite é independente da idade ou do número de gestações. Mas, de qualquer forma, a distensão dos ligamentos do trato reprodutivo, devido a partos múltiplos, faz com que o útero se posicione abaixo da cérvix (deslocamento caudo-ventral), no abdômen (LEBLANC et al., 1998), fazendo com a contração miometral não seja suficiente para empurrar o conteúdo uterino dorsal e caudalmente (LEBLANC et al., 1998). Outros fatores associados ao número de partos incluem: interações neuromusculares (RIGBY et al., 2001), falha na drenagem linfática (CAUSEY, 2006), devido a dilatação parcial do útero (TROEDSSON, 1999), angiopatias, resposta a hormônios (TROEDSSON, 1999; RIGBY et al., 2001) e alterações degenerativas



(LEBLANC, 2003a). Falha no sistema imune, super produção de muco (CARD, 2005; CAUSEY, 2006) e predisposição genética (LEBLANC, 2003a) também irão predispor à endometrite (WATSON, 2000), embora um embasamento genético ainda não tenha sido estabelecido (LEBLANC, 2003a). As barreiras físicas citadas anteriormente, protegem o útero de contaminação externa. Há uma maior predisposição à endometrite, em éguas com injúrias prévias causadas no parto, má conformação perineal (HURTGEN, 2006), alteração na posição da vulva e fechamento incompleto ou relaxamento permanente dos lábios vulvares (CASLICK, 1937). Essas anormalidades causam a entrada de ar, fezes e urina no trato reprodutivo (HURTGEN, 2006). Problemas na cérvix, como relaxamento insuficiente no estro (HURTGEN, 2006; PYCOCK, 2006) ou abertura no diestro (RAMBAGS, 2003), também predispõem a colonização bacteriana.

A inflamação é, geralmente, acompanhada pelo acúmulo de líquido intrauterino (LIU). O acúmulo de LIU foi, primeiramente, descrito em éguas (KNUDSEN, 1964), através de palpação retal. Entretanto, a ultrasonografia transretal tem sido mais aplicada (LOSINNO et al., 1997; ZENT et al., 1998; RIGBY et al., 2001; FUMUSO et al., 2003; PALM et al., 2008). O acúmulo de LIU no diestro está associado com redução significativa nas taxas de prenhez e aumento nas taxas de morte embrionária (ADAMS et al., 1987). A incidência de LIU, após a cobertura natural tem sido relatada em 15% de 746 ciclos (ZENT et al., 1998) e tão alta quanto 43% de 552 ciclos, em populações mistas (NEWCOMBE, 1997). As taxas de prenhez, neste último estudo, foram 49% em éguas com acúmulo de líquido 48h após a cobertura, comparadas com 62% das éguas sem líquido. Entretanto, Maslchitzky et al. (2003b) não encontraram diferença nas taxas de prenhez em relação à presença de LIU em éguas virgens e falhadas, entre o primeiro estro da temporada reprodutiva e os subsequentes. A importância do acúmulo de líquido não é clara (WATSON, 2000). De 15 a 39% das éguas acumulam líquido no estro (REILAS et al., 1997; ZENT et al., 1998) e 28% no diestro (ADAMS et al., 1987). Reilas et al. (1997) demonstraram que a motilidade espermática é afetada pelo LIU coletado no estro, porém as taxas de recuperação embrionária não. O estrógeno age no útero, durante o estro, para aumentar secreção endometrial e edema. Pensa-se que éguas que acumulam líquido no útero possuem mais glândulas com diâmetros maiores, que éguas sem acúmulo (RASCH et al., 1996). Isto sugere que a hipersecreção de muco contribui para o acúmulo de LIU. No entanto, a drenagem do líquido, através da cérvix e do sistema linfático também é importante. Éguas que acumulam LIU podem

apresentar fibrose cervical ou alterações anatômicas (LEBLANC et al., 1998) e, assim, a drenagem linfática passa a ser ineficiente (LEBLANC et al., 1995).

Acredita-se que as contrações uterinas possuem um papel crítico no mecanismo de limpeza uterina na égua (TROEDSSON, 2006), que consiste, basicamente, em movimentos ciliares e nas contrações miométrais (CAUSEY, 2007). Um desequilíbrio nesse sistema aumenta os riscos de desenvolvimento de endometrite (TROEDSSON, 1999). O padrão de contração miométral é diferente entre o estro e diestro (TROEDSSON et al., 1993a). A atividade durante o estro é caracterizada por impulsos curtos, distintos, com alta intensidade e sincronização marcada; enquanto que no diestro, a atividade é mais difusa, com maior duração e baixa intensidade e menos sincronização. Provavelmente, o padrão de contração do estro favorece a eliminação do conteúdo uterino. Defeitos na contração miométral podem contribuir para o desenvolvimento de endometrite (WATSON, 2000), uma vez que éguas com alta suscetibilidade possuem falha na contração miométral. Porém, a origem deste defeito é desconhecida (TROEDSSON, 1999). O atraso de algumas éguas ao limpar o útero de bactérias e material inerte foi, primeiramente, descrito, junto ao tratamento com progesterona e idade avançada por Evans et al. (1986). Os autores sugeriram que a limpeza física possui um papel importante na resistência de éguas à infecção uterina (EVANS et al., 1987). A existência do atraso na limpeza uterina foi confirmada por Troedsson & Liu (1991), através de marcadores não antigênicos. As éguas suscetíveis acumulam 6 vezes mais LIU, após desafio bacteriano (TROEDSSON & LIU, 1992) e sua atividade miométral demora mais tempo para iniciar e possui menor frequência, intensidade e duração do que a das resistentes (TROEDSSON et al., 1993b). LeBlanc et al. (1994) demonstraram que éguas sadias eliminaram 50% de um radiocolóide infundido no útero em estro, em 2 horas; enquanto que, éguas suscetíveis eliminaram quantidade insignificante, em 4 horas. Embora os mecanismos exatos da inabilidade do útero em eliminar o conteúdo não são conhecidos, parece que a atividade mioelétrica em resposta a inflamação é deficiente nessas éguas (TROEDSSON et al., 1993b). Sendo que a contração uterina, nas éguas suscetíveis, pode ser restaurada com a administração de drogas ecbólicas (LEBLANC et al., 1994), a falha na atividade miométral pode ser resultado de influências exógenas, como inibição da contratilidade ou indução de relaxamento (ALGHAMDI et al., 2005). Embora não tenham sido detectadas diferenças na concentração plasmática de hormônios ecbólicos em éguas resistentes e suscetíveis, no momento da inseminação, a administração de oxitocina, em éguas suscetíveis,

resultou em uma redução significativa de prostaglandina, comparadas a éguas resistentes (NIKOLAKOPOULOS et al., 2000) e melhores taxas de prenhez em éguas com acúmulo de LIU (RASCH et al., 1996). Entretanto, no estudo de Zent et al. (1998), o tratamento para o acúmulo de LIU com substâncias uterotônicas não apresentou efeito sobre o desempenho reprodutivo das éguas. A inibição da liberação de prostaglandina com um anti-inflamatório não-esteroidal como a fenilbutazona, resultou em atraso na limpeza de um radiocolóide em éguas resistentes (CADARIO et al., 1995). A prostaglandina auxilia na limpeza uterina, mas a uma taxa mais lenta que a oxitocina. Não se sabe se as éguas com problemas na limpeza uterina são capazes de responder à oxitocina fisiológica ou se a resposta difere daquela das éguas resistentes (CADARIO et al., 1999). Pode haver diferença entre esses dois grupos de éguas nos receptores uterinos para oxitocina ou em mecanismos pós-receptores (NIKOLAKOPOULOS et al., 2000). Porém, há evidências de que não há diferença na concentração de receptores endometriais para oxitocina, entre éguas resistentes e suscetíveis (CADARIO et al., 1999), embora os receptores miométrais não tenham sido mensurados.

Além da incapacidade de evacuação uterina que as éguas suscetíveis apresentam, o ambiente uterino inflamado é prejudicial aos espermatozóides (KATILA, 2005). Estudos *in vitro* demonstraram que em éguas com endometrite, a secreção endometrial inflamada reduz a motilidade espermática (TROEDSSON et al., 1998; ALGHAMDI et al., 2001). Independente do método de cobertura ser por monta natural ou inseminação artificial, a passagem da cérvix resulta em um processo inflamatório intenso causado pelos espermatozóides (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1997). Mesmo que bactérias sejam introduzidas, inevitavelmente, neste momento, foi demonstrado que a inflamação uterina é induzida na ausência de bactérias (KOTILAINEN et al., 1994; NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1997). Sabe-se que os espermatozóides são os maiores causadores da reação inflamatória uterina (TROEDSSON, 1999), já que atraem neutrófilos, possivelmente pela ativação do sistema complemento *in vitro* (TROEDSSON et al., 1995) e *in vivo* (KATILA, 1997). A inflamação uterina, medida pela presença de neutrófilos é maior as 2, 4 (FIALA et al., 2007) e 6 horas (KOTILAINEN et al., 1994) após a inseminação artificial, se o inseminado possui alta concentração de espermatozóides. Ao contrário, o plasma seminal protege os espermatozóides, fazendo com que sua presença possa modular a inflamação, permitindo que os espermatozóides passem do útero ao oviduto de forma segura, através

da inibição da migração de neutrófilos e da fagocitose *in vitro* (TROEDSSON et al., 2001) e *in vivo* (TROEDSSON et al., 2002).

#### 2.1.2.2 Infecção uterina com *Streptococcus zooepidemicus*

Desde muito tempo, as infecções genitais representam uma grande perda econômica para a indústria equina (JEFFCOTT et al., 1982). Acreditava-se que as bactérias introduzidas no útero pela cobertura eram a única fonte de endometrite e as pesquisas sobre a fisiopatologia da endometrite persistente eram realizadas com modelos de endometrite induzida por bactérias (TROEDSSON et al., 1993c). Porém, a endometrite bacteriana ainda pode representar problemas significativos para éguas que apresentam baixa resistência e para aquelas cobertas por monta natural (TROEDSSON, 2006).

A genitália das éguas abriga uma microflora, que consiste de várias espécies de bactérias inofensivas e algumas oportunistas, que podem ser patogênicas às éguas suscetíveis. Os garanhões também abrigam bactérias na genitália externa e no sêmen, sendo a cobertura uma das formas mais comuns de introdução de bactérias no útero (REILAS, 2001). A bactéria *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (*Streptococcus zooepidemicus*), provavelmente causa mais doenças em cavalos do que nas outras espécies (CAUSEY et al., 2006). Entretanto, sua importância não foi reconhecida por muito tempo (CHANTER, 1997). Esta bactéria é endêmica e comensal da mucosa do organismo e a mais comumente encontrada (FERREIRO et al., 1986) nos casos de endometrite, com taxa de isolamento ao redor de 66% (WATSON, 2000). Este cocco gram-positivo (CARD, 2005) pertence ao grupo C, na classificação de Lancefield (CHANTER, 1997). Quando a presença de mais de 5% de neutrófilos e cocos gram-positivos são identificados em amostras endometriais, a endometrite é provavelmente causada por *Streptococcus zooepidemicus* (CARD, 2005). Esta bactéria é oportunista (TIMONEY et al., 1995), mas para que a infecção estabeleça, depende da eficiência do sistema de defesa da égua (WATSON, 2000). *Streptococcus zooepidemicus* também foi identificado como o agente etiológico principal em 15 a 20% dos abortos (WELSH, 1984).

A resolução da infecção uterina depende do equilíbrio entre a defesa do hospedeiro e o número e virulência da bactéria. *Streptococcus zooepidemicus* possui a capacidade de se aderir fisicamente às células endometriais (WATSON et al., 1988). Outros patógenos causadores de infecção uterina são *Escherichia coli*, *Klebsiella*

*pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (TROEDSSON, 2006). Todas liberam toxinas, que danificam o endométrio e diminui a resistência à infecção bacteriana (WIDDERS et al., 1995; TROEDSSON, 2006).

As condições ideais para que ocorra a fagocitose dos estreptococos requerem anticorpos e complemento específicos (ASBURY et al., 1984; CAUSEY et al., 1995). O entendimento da resposta específica a *Streptococcus zooepidemicus* é necessária para entendermos a resistência a essa infecção uterina. *Streptococcus zooepidemicus* apresenta cepas antigenicamente distintas (CAUSEY et al., 2006; WIDDERS et al., 1995). As diferenças antigênicas afetam a resposta imune em diversas espécies. Coelho respondem de maneira altamente específica a um determinado isolado de *Streptococcus zooepidemicus* (MOORE & BRYANS, 1969). Em humanos, a resposta imune a *Streptococcus pyogenes* também é altamente específica a proteína M (HU et al., 2002), o maior determinante de virulência da bactéria (FISCHETTI, 1989). Equinos também desenvolvem resposta específica a isolados de *Streptococcus zooepidemicus* (CAUSEY et al., 2006; WIDDERS et al., 1995). No estudo de Causey et al. (2006), éguas responderam de forma específica a quatro cepas de *Streptococcus zooepidemicus* antigenicamente distintas, após infecção intrauterina. Porém, apenas a resposta sérica dos animais foi analisada e não a local. Mas, no estudo de Widders et al. (1995) foi demonstrado que, além da resposta sistêmica, existe sim, também, uma resposta uterina específica para *Streptococcus zooepidemicus*, determinada pelos níveis de IgG específica no soro e IgG e IgA específicas na secreção uterina. A resposta específica foi observada 7 dias após imunização prévia, intramuscular e intrauterina, dos animais com antígeno e adjuvante.

### 2.1.2.3 Líquido endometrial

O líquido endometrial possui um papel crítico na reprodução mamífera, pois a qualidade do ambiente uterino determina o desempenho reprodutivo da fêmea. Primeiramente, o útero possui várias funções: é o local de deposição do sêmen na espécie equina, contribui para o transporte dos espermatozóides ao oviduto, abriga e nutre o feto e, finalmente, o miométrio é essencial para expulsar o feto durante o parto (REILAS, 2001). Sua adaptação para receber o concepto, inclui o provimento de um ambiente adequado para o desenvolvimento do embrião. Tal ambiente é preparado pela síntese e secreção de substâncias no lúmen uterino. O líquido luminal uterino ou líquido endometrial é necessário para a capacitação e fertilização dos espermatozóides e o

desenvolvimento embrionário (TUNÓN et al., 1998). Vários estudos têm sido realizados para investigar sua composição: Pycock & Allen (1990) avaliaram a concentração protéica de lavagem uterina, após infusão com *Streptococcus zooepidemicus*, Malschitzky et al. (2007a) avaliaram e compararam o perfil protéico da secreção endometrial pura de éguas nas fases do ciclo estral, Tunón et al. (1998) e Alavi-Shoushtari et al. (2006) compararam a variação na concentração de proteínas no útero de éguas e vacas, respectivamente, com proteínas séricas, Malschitzky et al. (2007b) verificaram que o ambiente uterino da égua no primeiro diestro da temporada reprodutiva é diferente dos subseqüentes e Malschitzky et al. (2008) compararam a secreção uterina de éguas resistentes e suscetíveis e verificaram que a secreção é diferente, entre as duas categorias de éguas. Apesar da infertilidade na égua ser bem descrita, pouco se sabe sobre a resposta aguda sistêmica e a resposta imunológica local, que ocorre na endometrite (METTE et al., 2010).

#### 2.1.2.3.1 Componentes do líquido endometrial

Os componentes do líquido endometrial incluem mediadores inflamatórios, neutrófilos e proteínas plasmáticas, incluindo as imunoglobulinas, complemento e enzimas (WATSON et al., 1987a; KATILA et al., 1990; TROEDSSON et al., 1993c). Estes componentes aumentam de 30 minutos a 12 horas, após injúria uterina (WATSON et al., 1987a; KATILA et al. 1990). A migração dos PMNs parece não ser diferente, entre as éguas resistentes e as suscetíveis à endometrite (KATILA, 1996), pois não existe diferença no pico de neutrófilos, entre éguas resistentes e suscetíveis (KATILA, 1996). No entanto, nas éguas suscetíveis os neutrófilos permanecem em alto número, enquanto que, nas éguas resistentes, eles desaparecem em 48 horas (KATILA, 1995; KATILA, 1996). Mesmo assim, existe uma baixa correlação entre a categoria histológica endometrial moderada e o atraso na limpeza uterina (TROEDSSON et al., 1993b). As células inflamatórias crônicas, um dos determinantes de categoria endometrial, são componentes fisiológicos do endométrio equino e não são necessariamente indicativos de endometrite (WATSON & THOMSON, 1996). Acredita-se que as éguas que apresentam atraso na limpeza uterina possuem distúrbios no sistema imune, o que contribui para a persistência da infecção. Enquanto que o sistema imune das éguas resistentes é eficiente, o das suscetíveis não é. O porquê isso ocorre não se sabe claramente (FUMUSO et al., 2003; ROGAN et al., 2007). Acredita-

se, no entanto, que há uma falha no coordenamento por parte do sistema imune das éguas suscetíveis (METTE et al., 2010).

Os neutrófilos que chegam ao útero são a primeira linha de defesa contra bactérias e a migração sanguínea destas células de defesa é atraída por fatores quimiotáticos presentes no LIU (TROEDSSON, 2006), que aumentam após a infecção (FUMUSO et al., 2003). O aumento é devido a metabólitos da inflamação como o ácido araquidônico (WATSON et al., 1987b). Foi sugerido que os neutrófilos coletados de éguas suscetíveis, 12 horas após a infecção apresentam disfunção na migração em compartimentos quimiotáticos (LIU et al., 1986). No entanto, quando os neutrófilos foram removidos dos fatores uterinos, a migração dos neutrófilos foi semelhante entre as éguas resistentes e as suscetíveis (TROEDSSON et al., 1993d). Portanto, defeitos na migração dos neutrófilos, uma vez que essas células chegam ao local da inflamação é questionável. De acordo com estes resultados, Troedsson et al. (1993d) não observaram problemas na migração dos neutrófilos de éguas suscetíveis. Ao contrário, quando os neutrófilos foram colocados em um ambiente ótimo, aqueles coletados de éguas suscetíveis possuíam função fagocítica total (TROEDSSON et al., 1993d). Uma vez que os neutrófilos chegam ao lúmen uterino, sua capacidade em fagocitar e matar bactérias é crítica para eliminar a infecção. Como de fato, a habilidade fagocítica dos neutrófilos uterinos da secreção de éguas suscetíveis é menor que das resistentes (WATSON et al., 1987a; TROEDSSON et al., 1993d), foi concluído que fatores presentes na secreção uterina dessas éguas suscetíveis interferem na fagocitose.

A presença de complemento na secreção uterina é necessária para que ocorra a opsonização e fagocitose (BROWN et al., 1985; HAKANSSON et al., 1993). Uma deficiência no complemento foi sugerida por Asbury et al. 1984, que iniciaram o uso de terapia intrauterina plasmática. No entanto, Watson et al. (1987a) demonstraram que a atividade do complemento era maior nos lavados de éguas suscetíveis (WATSON et al., 1987a). Especialmente os complementos C3 e C5, juntamente com as imunoglobulinas, atraem e facilitam a fagocitose dos neutrófilos (TROEDSSON, 1997). Foi relatado por Watson et al. (1987a), que a secreção uterina de éguas suscetíveis foi, significativamente, pior em promover a fagocitose que a secreção de éguas resistentes. Pascoe (1995) sugeriu uma melhora na fagocitose dos neutrófilos na secreção uterina, através da adição de imunoglobulinas e complemento do plasma sanguíneo e Mattos et al. (1997a) e Mattos et al. (1999) observaram que a infusão uterina com plasma enriquecido com leucócitos melhorou as taxas de prenhez em éguas falhadas e com

potro ao pé. Além dos fatores de opsonização, os autores concluíram que a fagocitose foi aumentada pelo número extra de leucócitos adicionado ao ambiente inflamado.

Zerbe et al. (2003) observaram a resposta endometrial de PMNs, após desafio experimental com *Streptococcus zooepidemicus* e o efeito do tratamento subsequente com IL-8 recombinante humana. As éguas demonstraram uma resposta intensa a IL-8 e os PMNs foram atraídos e translocados para o útero, em 6 horas, após a administração. Esses PMNs intrauterinos apresentaram expressão diminuída do receptor para o MHC-I, mas um aumento significativo na expressão da molécula de adesão intercelular, CD11a, juntamente com aumento da geração de radicais livres.

As citocinas também estão presentes no líquido endometrial, com o desenvolvimento do processo inflamatório. Como elas possuem um papel crucial na modulação do processo sistêmico e local e são importantes para a resolução do mesmo (METTE et al., 2010), a expressão gênica de várias citocinas pró e anti-inflamatórias, tem sido estudada. Fumuso et al. (2003) avaliaram o padrão de transcrição endometrial de mRNA de três citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) em éguas resistentes e suscetíveis a endometrite, por três ciclos consecutivos, após tratamento com um imunomodulador, o extrato da parede celular de *Mycobacterium phlei* (MCWE). As éguas suscetíveis apresentaram aumento significativo na expressão de mRNA para todas as citocinas no estro. No diestro para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , quando comparadas às éguas resistentes e o tratamento das éguas suscetíveis com MCWE regulou os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no estro e IL-6 e TNF- $\alpha$  no diestro, resultando em níveis das citocinas similares aos das éguas resistentes. Adicionalmente, as éguas suscetíveis apresentam valores menores da citocina anti-inflamatória IL-10, comparadas às resistentes (FUMUSO et al., 2007). Mette et al. (2010), observaram aumento das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 no líquido endometrial de éguas com endometrite induzida com infusão de *E. coli*, 3 horas após a infusão.

### 2.1.3 APP e a endometrite

Existem poucos estudos sobre as APP envolvendo a endometrite. Em vacas (SHELDON et al., 2001) e ovelhas (REGASSA & NOAKES, 1999), foi sugerido que as APP são produzidas sistemicamente em animais com endometrite clínica. A concentração de Hp aumentou em ovelhas com endometrite pós-parto e as concentrações de AGP, Hp e Cp aumentaram em vacas com endometrite pós-parto, na presença de *Escherichia coli* e *Arcanobacterium pyogenes*.



Entretanto em éguas, um estudo recente demonstrou não haver aumento na concentração periférica de APP, após inseminação artificial com sêmen congelado (NASH et al., 2010). Em lavados uterinos de éguas em estro, Scudamore et al. (1994) observaram maior quantidade de AAT e Alb, em comparação ao diestro. Mas, não foi observada diferença na concentração dessas proteínas, antes e depois de indução de endometrite com *Streptococcus zooepidemicus*. Kolm et al. (2006) demonstraram que há maior expressão de lactoferrina no endométrio de éguas suscetíveis à endometrite do que resistentes e Mette et al. (2010) demonstraram a expressão de SAA no endométrio de éguas, após indução experimental de endometrite com *Escherichia coli*. Os autores observaram aumento local de 128 vezes da proteína e sistêmico de 590 vezes, 24 horas após a infecção bacteriana. O mesmo foi observado com o fibrinogênio plasmático, que aumentou em 24 horas, mas com aumento moderado (1,5 vezes). Também foi observado que os níveis de ferro diminuíram as 12 e 24 horas, mas retornaram ao normal em 36 horas após a infecção.

## 2.2 Glicocorticóides

Os glicocorticóides são hormônios esteróides polifuncionais (PEREIRA et al., 2002), secretados pela glândula supra-renal (ou adrenal), após estímulo por citocinas, sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (BOSSCHER et al., 2000). Os glicocorticóides regulam várias funções fisiológicas essenciais à vida (NICOLAIDES et al., 2010), pois estão envolvidos em quase todas as atividades moleculares e celulares do organismo e são o pivô de vários processos biológicos, como crescimento, metabolismo intermediário, reações imunes, reprodução, assim como funções cardiovasculares e neurais (GALON et al., 2002). Apresentam como funções principais a homeostasia de eletrólitos, como os íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), a mediação no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios e, principalmente, uma potente ação anti-inflamatória (PEREIRA et al., 2002). Esta gama ampla de efeitos, gerados pela administração de glicocorticóides endógenos e sintéticos, resulta em uma série de aplicações terapêuticas, que vão desde o tratamento de artrites, inflamações crônicas até o de doenças autoimunes e o tratamento de transplantes (BARNES, 2010). Mas a principal razão para a utilização dos glicocorticóides está relacionada à sua forte ação anti-inflamatória, imunomoduladora e analgésica (BOSSCHER et al., 2000; PACE et al., 2007; RASMUSSEN et al., 1998).

O mecanismo de ação celular e molecular dos glicocorticóides tem sido foco de pesquisas (GALON et al., 2002). Estudos *in vivo* e *in vitro* sugeriram tanto efeito estimulador quanto depressivo, através da ativação e inibição de vários genes pró e anti-inflamatórios e muitas discrepâncias têm emergido (FRANCHIMONT et al., 1999). Análises da regulação gênica pelos glicocorticóides estão sendo realizadas. Autores sugeriram que as ações anti-inflamatória e imunomoduladora ocorrem devido a inibição da atividade de vários fatores de transcrição como a proteína-1 ativadora (AP-1) e fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (PACE et al., 2007; LIBERMAN et al., 2007; LIBERMAN et al., 2009), envolvidos na ativação de genes pró-inflamatórios (BOSSCHER et al., 2000). Devido a sua natureza hormonal e lipofílica, os glicocorticóides passam livremente através da membrana celular (BOSSCHER et al., 2000) e agem através da ligação com proteínas intracelulares (NICOLAIDES et al., 2010), os receptores no citoplasma (BOSSCHER et al., 2000). O fator de transcrição NF- $\kappa$ B ativa genes que codificam as citocinas, receptores das citocinas, proteínas quimiotáticas e moléculas de adesão como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, INF- $\beta$ , molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), entre outras (BOSSCHER et al., 2000). Assim, vários estudos têm observado que os glicocorticóides podem diminuir ou aumentar a resposta inflamatória, dependendo, em parte, do tempo e do contexto da exposição celular (GALON et al., 2002). O perfil gênico de células mononucleares do sangue periférico, após incubação com dexametasona, demonstrou que alguns genes associados com a imunidade são induzidos (receptores para citocinas e proteínas carreadoras), enquanto que outros são deprimidos (IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN- $\gamma$ ), sugerindo que a modulação de genes associados à inflamação não é uniformemente imunodepressiva. Esta regulação gênica em direções opostas indica uma ação altamente complexa (GALON et al., 2002) e necessita de mais atenção.

Os glicocorticóides inibem a produção de citocinas, mas também atuam sinergicamente com várias delas. Em vários experimentos, os glicocorticóides agiram sinergicamente com citocinas exógenas. Este paradoxo não é bem entendido, tanto o mecanismo molecular, quanto a significância fisiológica (WIEGERS & REUL, 1998). Em situações *in vivo*, os glicocorticóides e as citocinas estão geralmente presentes em altas concentrações (BESEDOVSKY & DEL REY, 1996; LINTHORST et al., 1997). No órgão-alvo, a concentração fisiológica de corticosterona pode ser regulada pela enzima hidroxisteróide desidrogenase 11b (11b-HSD). Esta enzima converte os glicocorticóides ativos para sua forma inativa (MONDER, 1993). A atividade de 11b-HSD pode ser regulada por citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (ESCHER et al., 1997). A

presença de 11 $\beta$ -HSD, sozinha ou em combinação com citocinas, pode por regular a concentração de glicocorticóides ativos contribuir para o sinergismo entre as citocinas e esses hormônios (WIEGERS & REUL, 1998). No estudo de Hermoso et al. (2004), a dexametasona aumentou a expressão de um gene pró-inflamatório em conjunto com TNF- $\alpha$ , ao invés de atuarem como antagonistas na regulação da inflamação e da imunidade. Perez et al. (2005) observaram que a hidrocortisona em sinergia com a IL-15, induziu um aumento significativo na proliferação de células NK. Efeitos sinérgicos entre IL-1 e IL-6 e glicocorticóide foi observado em células B. A combinação desses agentes induz a produção de IgM e IgG pelas células B (EMILIE et al., 1988). A produção de IgE também é aumentada por glicocorticóide e IL-4 (WU et al., 1991). Eosinófilos, na presença de glicocorticóide, expressaram níveis aumentados da molécula de adesão MHC-II e da IL-3 e IL-5, levando ao aumento na apresentação de antígenos (GUIDA et al., 1994). Outros mediadores como a IL-2 (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 1989), IFN- $\gamma$  (BERGSTEINDOTTIR et al., 1992) e fator estimulador de colônias de granulócitos (SHIEH et al., 1993) também aumentam na presença de glicocorticóide.

Outros estudos demonstraram que os glicocorticóides induzem a apoptose da maioria das células nucleadas do sistema vascular como neutrófilos e monócitos periféricos, por exemplo. Porém, o mecanismo de ação não está totalmente elucidado (COX, 1995). A dexametasona induz a apoptose celular, através do aumento na expressão de genes pró-apoptóticos (CONRADIE et al., 2007), na produção de IL-6 e IL-8 e na transcrição de moléculas de adesão, que atuam no tráfego celular (DING et al., 2010). O estímulo da IL-6 (SILVERMAN et al., 2004) contribui para o feedback positivo, aumentando a migração e a ativação de células inflamatórias para o local da injúria (DING et al., 2010) e aumentando a liberação de glicocorticóides pela própria IL-6 (SILVERMAN et al., 2004). No entanto, o efeito apoptótico dos glicocorticóides depende da natureza do estímulo. Enquanto que o glicocorticóide sozinho induz a apoptose de linfócitos, quando aplicado junto com um receptor-celular-T (TCR) ambos os sinais aumentam o tempo de vida das células comprometidas (WILCKENS & DE RIJK, 1997).

Os glicocorticóides também influenciam a produção hepática das APP. Acredita-se que a Hp é induzida por cortisol endógeno, liberado em resposta a qualquer estímulo inflamatório (CERÓN et al., 2005) e pode, também, ser induzida por terapia com esteróides (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2004). No trabalho de Slocombe & Colditz (2005), foi observado em bovinos, que o stress causado por diferentes fatores, como

desmane, transporte e manejo intensivo, aumentam significativamente a concentração de Hp. Em cães, foi demonstrado que o tratamento com diferentes glicocorticóides aumenta, significativamente, a concentração de Hp sérica, com aumentos maiores associados à terapia prolongada (LOWRIE et al., 2009; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2004). Em culturas de células hepáticas, os glicocorticóides potencializam a indução da expressão de AGP pelas citocinas IL-1 e IL-6 (BAUMANN & GAULDIE, 1994). Os glicocorticóides e a IL-6 induzem a síntese de AGP, através da ligação direta, proteína-proteína, entre o receptor de glicocorticóide e a IL-6 (NISHIO et al., 1993). Baumann et al. (1987) relataram que a dexametasona aumentou, em várias vezes, a produção de IFN- $\beta$  e em sinergia com a IL-1 aumentaram a síntese da AGP. No entanto, foi observado que os glicocorticóides inibiram a expressão de IFN- $\beta$  e IL-8, mas aumentaram, significativamente, a expressão das proteínas CRP, SAA e C3 (ZHANG et al., 2005; ZHANG et al., 2007).

Foi demonstrado que os glicocorticóides inibem a produção de óxido nítrico em vários tipos de células e reduzem os níveis de mRNA para iNOS (PUDRITH et al., 2010; SHINODA et al., 2003). A dexametasona reduz a formação de nitrito, um dos produtos estáveis finais da síntese de óxido nítrico e inibe a expressão de mRNA para iNOS em 50% (WALKER et al., 1997), devido à inibição da expressão gênica da iNOS (D'ACQUISTO et al., 1997).

### **2.3 Glicocorticóides no tratamento da endometrite**

Uma ampla variedade de protocolos para o tratamento da endometrite está sendo utilizada, com a finalidade de controlar a endometrite, mas nenhum tratamento sozinho tem sido aceito como eficaz. A modulação da resposta inflamatória uterina, através da corticoterapia está sendo proposta como eficaz. No trabalho de Bucca et al. (2008), foi proposta a modulação da resposta inflamatória no momento da cobertura como um procedimento efetivo para controlar os eventos que levam à endometrite. Foi observado uma diminuição de edema uterino e acúmulo de LIU e uma melhor qualidade do líquido coletado (menos tubidez), embora o número de PMN não tenha sido afetado. O autor sugere que essa modulação da reação uterina, após a cobertura cria um ambiente uterino menos favorável à colonização bacteriana. Dell'Aqua Jr. et al. (2006) demonstraram melhora significativa na taxa de prenhez, quando éguas com histórico reprodutivo pobre foram tratadas com um glicocorticóide. Estes resultados estão de acordo com Papa et al. (2008) que também observaram que a corticoterapia aumentou as taxas de prenhez de

éguas com histórico de endometrite, enquanto que em éguas resistentes não houve diferença significativa na taxa de prenhez, entre as éguas tratadas e as que não foram tratadas com o glicocorticóide. Entretanto, Vandaele et al. (2010) não verificaram influência da corticoterapia sobre a taxa de prenhez em uma população de éguas com e sem acúmulo de LIU, antes e depois de inseminação artificial.

#### **2.4 Eletroforese bi-dimensional**

Desde o desenvolvimento, há mais de 35 anos, da eletroforese bi-dimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) por Klose (1975) e O'Farrell (1975), esta tem sido a técnica de escolha para a análise de proteínas em uma variedade de células, tecidos e líquidos. A 2D-PAGE promove uma análise protéica de alta resolução e, portanto, possui um papel central na proteômica (CELIS & GROMOV, 1999), a área que estuda a compreensão e a representação de proteínas expressas por um genoma, em um determinado momento. Enquanto que o genoma é estático, seu proteoma correspondente é responsivo e dinâmico e varia amplamente entre organismos (CHOE et al., 2006). Este novo campo de pesquisa envolve a combinação de várias técnicas para separar (eletroforese), identificar (espectrometria de massa, *Immunoblotting*), quantificar e armazenar (análise de imagens, *softwares*) dados e informações (NOOIJ et al, 1990; BERGQUIST et al., 2007; WU et al., 2007). O proteoma responde a e reflete influências ambientais, estágios de desenvolvimento e o status sanitário (CHOE et al., 2006). A proteômica, juntamente com a genômica, bibliotecas de anticorpos e a bioinformática, formam um conjunto de tecnologias impressionantes para o estudo da expressão gênica, tanto em animais saudáveis, como nos doentes. A proteômica tem recebido força para o desenvolvimento de tecnologias com a finalidade de estudar doenças e medicamentos, através da marcação de proteínas-alvo (CELIS & GROMOV, 1999).

A técnica 2D-PAGE separa as proteínas em duas etapas e o seu poder de resolução é muito superior ao da eletroforese uni-dimensional. A 2D-PAGE pode ser utilizada para comparar perfis de expressão protéica e quantificar e qualificar as proteínas detectadas (CELIS & GROMOV, 1999). Os perfis protéicos podem ser escaneados e quantificados para pesquisar diferenças, como nos níveis de expressão e os resultados interessantes podem ser identificados, através do sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massa (GROSSERT, 2001; BERGQUIST et al., 2007) e *Immunoblotting* (NOOIJ et al, 1990). Enquanto que cada dimensão sozinha consegue

separar em média 200 tipos de proteínas diferentes, o uso sequencial de duas dimensões possui a capacidade de separar a quantia de 10.000 proteínas, em uma única amostra (MIKLOS & MALESKA, 2001). Isso é muito relevante, uma vez que as células eucariotas consistem em um arranjo de no mínimo 10.000 proteínas diferentes e exibem uma margem ampla de concentrações (GÖRG et al., 2004). Outra vantagem da eletroforese bi-dimensional é nos casos de limitação de amostra, pois as proteínas separadas podem ser arquivadas nos géis, indefinidamente, depois de gravadas suas imagens. Isto permite a caracterização das proteínas em uma data posterior, sem a necessidade de repetir o experimento (CHOE et al., 2006).

Os trabalhos de 1975 combinaram duas metodologias pré-estabelecidas, a de focalização isoeétrica (IEF) e a de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), em um formato bi-dimensional que separa as proteínas de forma efetiva na primeira dimensão pelo ponto isoeétrico e na segunda dimensão, de acordo com o peso molecular (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). Na área da reprodução, esta técnica tem sido utilizada para a determinação de marcadores da fertilidade e congelabilidade no sêmen de touros (KILLIAN et al., 1993; JOBIM et al., 2004; MOURA et al., 2007) e da suscetibilidade à endometrite em éguas (MALSCHITZKY et al., 2007a; MALSCHITZKY et al., 2007b; MALSCHITZKY et al., 2008 ).

## **2.5 Espectrometria de massa**

A espectrometria de massa foi criada há 100 anos, pelo ganhador do prêmio Nobel Sir J. J. Thompson, que identificou íons de pequena massa molecular, em um espectrógrafo de massa (BERGQUIST et al., 2007). Desde então, esta técnica tem sido utilizada em situações diversas, mas tornou-se mais proeminente, nos últimos anos, no campo de identificação de proteínas (BERGQUIST et al., 2007) devido, em grande parte, ao projeto de sequenciamento do genoma humano (VENTER et al., 2001). O objetivo da técnica é identificar as proteínas, codificadas por genes e determinar suas funções no organismo hospedeiro (BERGQUIST et al., 2007). As bandas protéicas de interesse são excisadas do gel de poliacrilamida e digeridos por proteases específicas, como a tripsina (SHEVCHENKO et al., 1996) e os peptídeos resultantes passam pela espectrometria de massa. A técnica é descrita em detalhes por Finehout & Lee (2004).

### 3. ARTIGOS

**3.1 Artigo 1.** Persistent post-breeding endometritis: effect of corticosteroid treatment on the number of protein bands from uterine endometrial fluid of susceptible mares. *Pferdeheilkunde*, v. 26, n. 1, p. 22-24, 2010.

**Endometrite persistente pós-cobertura: efeito do tratamento com corticosteróide sobre o número de bandas protéicas do líquido endometrial de éguas suscetíveis**

Caroline Antoniazzi Wolf<sup>1,2</sup>, Eduardo Malschitzky<sup>3</sup>, Gabriel Monteiro Davolli<sup>1</sup>, Maria Inês Mascarenhas Jobim<sup>2</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1,4</sup>

*1 – Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS*

*2 – Laboratório de Proteínas da Reprodução Animal*

*3 – Curso de Medicina Veterinária, ULBRA*

*4 – Pesquisador do CNPq*

#### Resumo

O objetivo deste estudo é comparar o número de bandas protéicas do líquido endometrial (perfil protéico) de éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura, infectadas ou não infectadas com a bactéria *Streptococcus zooepidemicus* e tratadas com um anti-inflamatório esteroide, com o de éguas não tratadas. Este estudo foi realizado de Janeiro de 2008 a Março de 2009. Durante o estro, o líquido endometrial puro de 16 éguas foi coletado, através de tampão vaginal. Foram constituídos quatro grupos: G1 – controle, G2 – tratado com 20 mg de isoflupredona, a cada 12 horas, por três dias consecutivos, G3 – infecção experimental com *Streptococcus zooepidemicus* e G4 – infecção experimental com *Streptococcus zooepidemicus* e tratamento com corticosteróide (idem ao G2). As amostras foram processadas e submetidas à eletroforese bi-dimensional. Os géis de eletroforese foram escaneados e analisados para determinar o número de bandas protéicas. Os géis das amostras de endométrio apresentaram o número máximo de 33 bandas no G1, 54 no G2, 51 no G3 e 72 no G4. Os spots protéicos foram entre 15 a 105 kDa de peso molecular e ponto isoelétrico entre 4.3 a 10.0. Foi observado um aumento no número de bandas protéicas nos grupos 2 e 4. O tratamento com anti-inflamatório esteroide pode alterar o

perfil protéico do líquido endometrial de éguas suscetíveis, pelo aumento no número de bandas protéicas.

**Palavras-chave:** reprodução, endometrite, corticosteróide, equino, líquido endometrial, proteínas, eletroforese.

**Persistent post-breeding endometritis: effect of a corticosteroid treatment on the number of protein bands from the endometrial fluid of susceptible mares**

**Abstract**

The aim of this study is to compare the number of endometrial fluid protein bands (protein profile) of mares susceptible to persistent post-breeding endometritis (PPBEM), infected or non-infected with bacteria *Streptococcus zooepidemicus*, treated with a steroidal anti-inflammatory drug with the ones from non-treated mares. This study was conducted from January 2008 to March 2009. During estrus, pure endometrial fluid of 16 cyclic warmblood mares was recovered by the use of vaginal tampons for specimen collection. Four groups were constituted: G1 – control, G2 – treated with 20 mg isoflupredone acetate, every 12h, for 3 days, G3 – experimental infection with *Streptococcus zooepidemicus* and G4 – experimental infection with *Streptococcus zooepidemicus* and treated with corticosteroid treatment (same as in G2). Samples were processed and submitted to two-dimensional electrophoresis technique according to O'Farrell et al. (1977), modified by Rodnight et al. (1988). Electrophoresis gels were scanned and analyzed to determine the number of endometrial protein bands. Endometrial electrophoresis gels showed 33 protein bands in G1, 54 in G2, 51 in G3 and 72 in G4. Protein spots ranged from 15 to 105 kDa molecular weights and pH 4.3 to 10.0 isoelectric points. An increase in the number of protein bands was observed in the two corticosteroid treated groups (G2 and G4). Treatment with steroidal anti-inflammatory drug isoflupredone can alter the number of endometrial fluid protein profile of estrus mares susceptible to PPBEM, by an increase in the number of protein bands.

**Keywords:** Reproduction, endometritis, corticosteroid, equine, endometrial fluid, proteins, electrophoresis.



## **Introdução**

A endometrite é um evento fisiológico, que ocorre após a cobertura (WATSON, 2000) devido à resposta induzida pela deposição de sêmen no lúmen uterino da égua (KOTILAINEN et al., 1994; FIALA et al., 2007). Esta reação inflamatória serve para eliminar o excesso de espermatozóides e bactérias inoculadas no momento da cobertura (KOTILAINEN et al., 1994; TROEDSSON et al., 1995; FIALA et al., 2007). No entanto, se a inflamação persiste o ambiente resultante é incompatível com o estabelecimento da prenhez (WATSON, 2000). As éguas que não eliminam a inflamação em 96 horas após a cobertura e acumulam líquido no lúmen uterino (LEBLANC, 2003) são classificadas como suscetíveis e acredita-se que possuem falha na limpeza física do útero. O acúmulo de líquido intrauterino (LIU) durante o estro foi associado com alterações na composição da secreção uterina. A média da concentração de proteínas totais na secreção uterina de éguas com LIU era um terço da encontrada em éguas sem essa condição. Isso, provavelmente, indica que o líquido endometrial é composto de secreção glandular e de transudato (REILAS, 2001). Foi descrito que o tratamento com corticosteróide, antes da cobertura, aumenta as taxas de prenhez de éguas suscetíveis (DELL'AQUA Jr. et al., 2006). O objetivo deste estudo é comparar o número de bandas protéicas (perfil protéico) de éguas suscetíveis, infectadas ou não infectadas com *Streptococcus zooepidemicus*, tratadas com um anti-inflamatório esteroidal, com o de éguas não tratadas.

## **Material e Métodos**

Este estudo foi conduzido de Janeiro de 2008 a Março de 2009. Um total de 16 éguas, com idade de 4 a 30 anos, de um rebanho experimental, foram utilizadas. Os animais eram mantidos a campo, suplementados com ração e feno.

### *Seleção das éguas*

As éguas foram submetidas a exame reprodutivo, incluindo avaliação da conformação perineal, palpação retal e ultrasonografia. Apenas éguas clinicamente sadias foram utilizadas. Os exames de palpação e ultrasonografia foram realizados diariamente para avaliar crescimento folicular, grau de edema uterino e presença de acúmulo de líquido intrauterino (LIU). As éguas foram classificadas como suscetíveis, de acordo com o histórico de estudos anteriores. As éguas foram consideradas suscetíveis quando acúmulo de LIU foi detectado por exame ultrasonográfico do útero,

48 horas após indução de inflamação uterina causada pela deposição de sêmen após inseminação artificial.

#### *Tratamento e infecção experimental*

Após a seleção dos animais, o experimento iniciou quando foram observados um folículo pré-ovulatório (>35mm) e uma imagem uterina característica de estro, no exame de ultrasonografia. Todas as éguas passaram pelos quatro grupos constituídos, com um estro de intervalo, entre os tratamentos. Os grupos foram: G1 controle: primeiro estro do experimento, as éguas não receberam nenhum tratamento. G2 tratado: terceiro estro, as éguas receberam administração de 20 mg de acetato de isoflupredona, a cada 12 horas, por três dias consecutivos. G3 infectado: quinto estro, as éguas foram inoculadas com  $1 \times 10^9$  *Streptococcus zooepidemicus* e G4 infectado + tratado: sétimo estro, as éguas foram inoculadas com  $1 \times 10^9$  *Streptococcus zooepidemicus* e receberam tratamento com corticosteróide, idem ao G2. A bactéria foi inoculada no segundo dia de tratamento. A infecção experimental foi realizada através de infusão de uma cultura bacteriana, suspendida em 20 mL de solução salina, com o uso de uma pipeta de inseminação, no útero. Todas as éguas foram tratadas com lavagem uterina e infusão local de antibiótico, até a confirmação de livre de inflamação. Adicionalmente, é importante relatar que, em algumas ocasiões, no momento da coleta das amostras, pouco volume de secreção foi coletado, pois algumas éguas não produziram líquido suficiente. Estas amostras não foram consideradas no estudo. E também, uma égua desenvolveu endometrite permanente, após a infecção. A endometrite não respondeu ao tratamento, até que a égua entrou em anestro sazonal, portanto, esta égua foi retirada do experimento.

#### *Coleta e processamento das amostras*

As amostras foram coletadas 12 horas depois, com o uso de um tampão vaginal comercial de algodão (mini OB<sup>®</sup> - Johnson & Johnson), inserido assepticamente no útero. A técnica utilizada para a coleta foi uma modificação do procedimento descrito por Reilas (2001). Uma linha extra de 50 cm foi amarrada no tampão, o qual ultrapassou a cervix e chegou ao útero, utilizando uma técnica de luva dupla modificada. A parte distal da luva retal foi cortada no punho para formar um tubo plástico. Uma mão enluvada, segurando o tampão, foi inserida no tubo plástico e então, a extremidade deste foi fechada com os dedos. A mão enluvada foi liberada do tubo plástico antes de

alcançar a cérvix. O tampão foi mantido no útero por 30 minutos e retirado do lúmen uterino protegido por uma mão enluvada. Após a remoção do tampão, cada tampão foi inserido em uma seringa de 20 mL e o líquido absorvido foi espremido em um tubo estéril. Alíquotas de 2 mL de secreção endometrial foram centrifugadas a 1.500 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para criotubos e armazenado em nitrogênio líquido, até os ensaios.

### *Eletroforese*

As amostras foram descongeladas, re-centrifugadas a 10.000 x g, por 60 minutos, a 4°C e uma alíquota de 50µl do sobrenadante foi retirada e transferida para criotubos para armazenamento a -80°C. A concentração de proteínas foi determinada, de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) (1mg/ml), como padrão. As amostras endometriais de duas éguas apresentaram quantidade insuficiente de proteína e não foram adequadas para realizar a eletroforese. As amostras das secreções endometriais foram submetidas, em duplicata, a eletroforese bi-dimensional, técnica descrita por O'Farrell et al. (1977), modificada por Rodnight et al. (1988). Os géis foram imersos em uma solução de *Comassie brilliant blue R-250* a 0,15% (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA), metanol a 53%, ácido acético a 7% e água e corados *overnight*. Os géis foram descorados em uma mistura de 50% de metanol, 7% de ácido acético e água, com um mínimo de 5 trocas de solução. Os géis foram equilibrados em uma solução de metanol a 50%, glicerol a 1% e água, por 2 horas. Os géis foram, então, colocados entre duas lâminas de celofane até secarem. Após, os géis foram escaneados (Hewlet-Packard 6100C, Palo Alto, CA, EUA) e analisados por um *software (Optiquant Acquisition & Analysis, versão 02.00, Canberra, Austrália)* para determinar o número de bandas protéicas.

### **Resultados**

Amostras endometriais de 16 éguas foram coletadas e um total de 40 géis foram analisados. Os spots protéicos variaram entre 15 e 105 kDa e ponto isoelétrico entre 4,3 a 10,0 (Figura 1). Foi contado o número máximo de 33 bandas protéicas no G1, 54 no G2, 51 no G3 e 72 no G4.

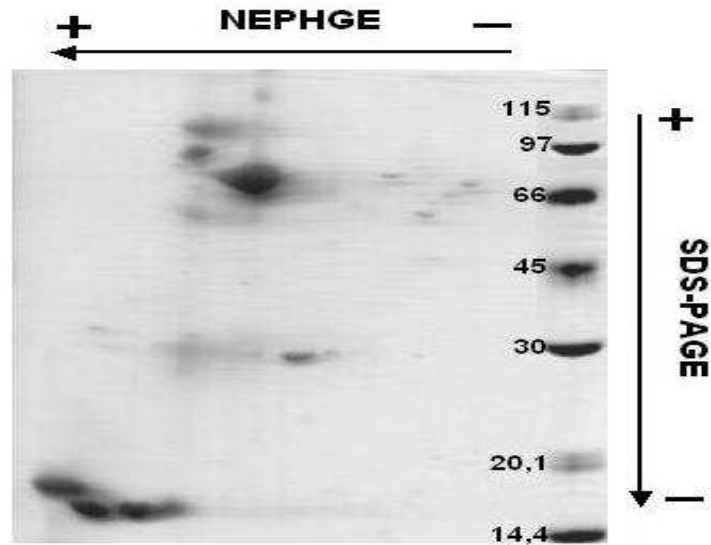


Figura 1 – Exemplo de um gel de poliacrilamida bi-dimensional de proteínas da secreção endometrial, grupo Controle. Gel bi-dimensional de SDS-PAGE a 12%, corado com Coomassie Blue. A seta horizontal na parte superior demonstra a direção do gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE), do terminal básico (+) para o ácido (-), na primeira dimensão. O marcador de peso molecular (escada) está à direita.

### Discussão

Foi observado um aumento no número de bandas contadas, nos dois grupos tratados (G2 e G4). Este aumento pode ser explicado pela presença de proteínas anti-inflamatórias (como algumas citocinas anti-inflamatórias, por exemplo), causado pela ação potente dos corticosteróides. Malschitzky et al. (2008) observaram uma densidade óptica maior e maior frequência em 12 e 8 bandas protéicas, respectivamente, em amostras de éguas suscetíveis, comparadas às resistentes. Em 11 spots foi possível ver uma relação com proteínas já descritas em cavalos, das quais 6 podem estar envolvidas no processo inflamatório. Fumuso et al. (2003) descreveram que éguas suscetíveis apresentam níveis mais altos na expressão de mRNA para quatro citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8), antes da cobertura, comparadas às resistentes. A presença de concentração de óxido nítrico, 13 horas após inseminação artificial foi observada por Alghamdi & Troedsson (2002), que demonstraram que o total de óxido nítrico foi significativamente superior nas éguas suscetíveis, do que nas resistentes. O óxido nítrico é um mediador que provoca o relaxamento da musculatura lisa em diferentes órgãos, incluindo o útero. Portanto, níveis altos de óxido nítrico na secreção uterina de éguas suscetíveis pode ser a causa ou o efeito da suscetibilidade. Éguas resistentes são capazes de eliminar os produtos inflamatórios assim que são gerados, enquanto que as suscetíveis falham ao fazê-lo, espontaneamente, devido ao

útero penduloso e posicionado profundamente na cavidade abdominal, resultando em acúmulo de óxido nítrico (ALGHAMDI & TROEDSSON, 2002). Conseqüentemente, o miométrio não consegue contrair e os produtos inflamatórios acumulam, atuando como um estímulo contínuo a endometrite. O uso de prednisolona, próximo ao momento da cobertura, resultou em taxas de prenhez mais altas em éguas suscetíveis, comparadas as não tratadas (DELL'AQUA Jr. et al., 2006). Os corticosteróides promovem a redução na expressão de várias citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-3, IL-5 e IL-8 reduzindo, assim, a inflamação. Adicionalmente, a administração de corticosteróides reduz os níveis de óxido nítrico e enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandinas e leucotrienos e diminui a atividade de moléculas de adesão, que reduz a migração de leucócitos dos vasos sanguíneos (JANEWAY et al., 1999).

Outra hipótese é que algumas dessas proteínas presentes no líquido endometrial após o tratamento com o corticosteróide não possuem papel específico durante o processo inflamatório, mas outras funções ainda não elucidadas. Mesmo assim, é esperado um aumento na expressão de citocinas anti-inflamatórias para controlar a expressão das citocinas pró-inflamatórias no ambiente uterino da égua suscetível, numa tentativa de restaurar o equilíbrio ao seu sistema imune descoordenado. Em conclusão, o tratamento com o anti-inflamatório esteroideal, isoflupredona, pode alterar o perfil protéico do líquido endometrial de éguas suscetíveis a endometrite, durante o estro, promovendo um aumento no número de bandas protéicas. Estudos futuros são necessários para identificar as proteínas envolvidas na inflamação e elucidar suas funções, se possivelmente estão associadas ou não ao tratamento com corticosteróides.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq pelo financiamento deste estudo.

### **Referências**

Alghamdi, A. S.; Troedsson, M. H. T. Concentration in nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis.

**Theriogenology**, v. 58, p.445-448, 2002.

Dell'Aqua Jr., J. A.; Papa, F. O.; Lopes, M. D.; Alvarenga, M. A.; Macedo, L. P.; Melo, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 270-273, 2006.

Fiala, S. M.; Pimentel, C. A.; Mattos, A. L. G.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v. 67, p. 556-562, 2007.

Fumuso, E.; Giguère, S.; Wade, J.; Rogan, D.; Videla-Dorna, I.; Bowden, R. A. Endometrial IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 31-41, 2003.

Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Capra, J. D. The Humoral Immune Response. IN: Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Capra, J. D. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 4 ed. London: Current Biology Publications, p. 307-361, 1999.

Kotilainen, T.; Huhtinen, M.; Katila, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 41, p. 629-636, 1994.

Leblanc, M. M. Persistent mating induced endometritis. In: Robinson, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine 5**. Philadelphia:Saunders, p. 234-237, 2003.

Lowry, O. H.; Rosebrough, J. W.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

Malschitzky, E.; Fiala, S.; Esmeraldino, A. T.; Neves, A. P.; Garbade, P.; Jobim, M. I. M.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 74-78, 2008.

O'Farrell, P. Z.; Goodman, H. M.; O'Farrell, P. H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, v. 12, p. 1133-1142, 1977.

Reilas, T. Uterine luminal environment of the mare. **Academic dissertation**, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 391p, 2001.

Rodnight, R.; Zamani, R.; Tweedale, A. An investigation of experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 24, p. 27-38, 1988.

Troedsson, M. H. T.; Steiger, B. N.; Ibrahim, M. N.; Foster, D. N.; Crabo, B. G. Mechanism of sperm induced endometritis in the mare. **Biology of Reproduction**, Supplement 52, p. 307-307, 1995.

Watson, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 221-232, 2000.

**3.2. Artigo 2.** Enviado para publicação no periódico Theriogenology.

**Efeito da corticoterapia sobre a proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura**

Caroline Antoniazzi Wolf<sup>1,2\*</sup>, Eduardo Malschitzky<sup>3</sup>, Maria Inês Mascarenhas Jobim<sup>2</sup>,  
Rodrigo Costa Mattos<sup>1,4</sup>

*1 – Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS*

*2 – Laboratório de Tecnologia de Sêmen e Proteínas relacionadas à Reprodução Animal,  
Faculdade de Veterinária, UFRGS*

*3 – Curso de Medicina Veterinária, ULBRA*

*4 – Pesquisador do CNPq*

**Resumo**

O objetivo deste estudo é verificar o efeito da corticoterapia aplicada na presença e na ausência de inflamação uterina sobre a proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite. Onze éguas foram sincronizadas com 5 mg de prostaglandina F<sub>2α</sub> e após a verificação dos sinais de estro foram submetidas a quatro tratamentos. O primeiro foi o do grupo Controle, que não recebeu nenhum tipo de tratamento. O segundo foi o do grupo GC, onde as éguas receberam administração de um glicocorticóide, a cada 12 horas, por três dias consecutivos. O terceiro foi o do grupo Infectado, onde foi realizada infusão intrauterina de *Streptococcus zooepidemicus* (1x10<sup>9</sup>/mL) e o quarto foi o do grupo GC + Infectado, onde as éguas receberam a administração do glicocorticóide e a infusão intrauterina, da mesma forma que os grupos GC e Infectado. Doze horas após o final de cada tratamento, as amostras foram coletadas e submetidas à eletroforese bi-dimensional para separação protéica e espectrometria de massa para a identificação das bandas protéicas relevantes. A corticoterapia provocou alteração na proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis, caracterizada pelo aumento e/ou diminuição na densidade óptica relativa e/ou na frequência de proteínas da fase aguda da inflamação, sendo as maiores alterações

\* Autora para correspondência. Email: [cvetwolf@yahoo.com.br](mailto:cvetwolf@yahoo.com.br)  
Tel: +55(51)9824-6875



observadas quando a corticoterapia foi aplicada na presença de um processo infeccioso. Adicionalmente, a infecção do lúmen uterino provocou alterações na proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis, caracterizadas pelo aumento e/ou diminuição na densidade óptica relativa e/ou na frequência de proteínas da fase aguda da inflamação. Os resultados do presente estudo demonstram que os glicocorticóides influenciam a resposta imune, não apenas como depressivos, mas estimuladores da defesa local, através de uma imunomodulação. Sugere-se que a corticoterapia, não prolongada, como a realizada neste estudo, pode ser benéfica para o tratamento de processos infecciosos uterinos.

**Palavras-chave:** endometrite, égua, proteínas da fase aguda, glicocorticóide, eletroforese.

*Effect of corticotherapy on the proteomics of the endometrial fluid from mares susceptible to persistent post-breeding endometritis*

**Abstract**

The objective of this study is to verify the effect of corticotherapy applied in the presence and in the absence of uterine inflammation on the endometrial fluid proteomics from mares susceptible to endometritis. Eleven mares were synchronized with 5 mg prostaglandin F<sub>2α</sub> and after the observation of the signs of estrus were submitted to four treatments. The first was of the Control treatment, which did not receive any kind of treatment. The second was of the GC treatment, where mares received glucocorticoid administration, each 12 hours, for three consecutive days. The third was the Infected treatment, where it was performed intrauterine infusion of *Streptococcus zooepidemicus* (1x10<sup>9</sup>/mL) and the fourth was the GC + Infected treatment, where mares received the administration of glucocorticoid and intrauterine infusion in the same way as GC and Infected treatments. Twelve hours after the end of each treatment, uterine samples were collected and submitted to two-dimensional electrophoresis for protein separation and mass spectrometry for the identification of relevant protein bands. Corticotherapy provoked an alteration in the proteomics of the endometrial fluid from susceptible mares, characterized by an increase and/or a decrease on the relative optic density and/or frequency of inflammatory acute phase proteins, with the major alterations occurring when corticotherapy was applied in the presence of an

infectious process. Additionally, the uterine lumen infection provoked alterations in the proteomics of the endometrial fluid from susceptible mares, characterized by an increase and/or a decrease on the relative optic density and/or frequency of inflammatory acute phase proteins. Results of the present study show that glucocorticoids influence the immune response, not only as suppressors, but enhancers of local defense, through an immunomodulation. It is suggested that non-prolonged corticotherapy, as performed in this study, can be beneficial for the treatment of uterine infectious processes.

**Keywords:** endometritis, mare, acute phase proteins, glucocorticoid, electrophoresis.

### **Introdução**

A endometrite é uma das maiores causas de infertilidade na égua (LIU & TROEDSSON, 2008). A forma mais comum de endometrite é a induzida pela cobertura (ALGHAMDI et al., 2005), um evento fisiológico, que serve para eliminar o excesso de sêmen e bactérias introduzidos no útero (TROEDSSON, 1999). As éguas que não eliminam a inflamação desenvolvem uma endometrite persistente após a cobertura (LEBLANC et al., 1998) e são classificadas como suscetíveis (TROEDSSON & LIU, 1991). A suscetibilidade atinge 15% de éguas puro sangue de corrida (ZENT et al., 1998) e a taxa de morte embrionária é três vezes maior nas éguas que apresentam essa condição (MALSCHITZKY et al., 2003).

Apesar do conceito de égua resistente e suscetível ser estabelecido há décadas, ainda não está claro o que falha na defesa uterina das éguas suscetíveis. Acredita-se que o sistema imune defeituoso ou desequilibrado esteja envolvido, mas pouco se sabe, no entanto, sobre as alterações imunológicas locais que acompanham a endometrite (METTE et al., 2010). Sendo assim, a composição do líquido endometrial tem sido muito estudada. Foi demonstrado que éguas resistentes e suscetíveis apresentam diferença na composição protéica do líquido endometrial (MALSCHITZKY et al., 2008), sendo que a das últimas apresenta maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e menor de anti-inflamatórias (FUMUSO et al., 2003; FUMUSO et al., 2006). Entretanto, a administração de um imunomodulador provocou alterações protéicas, como o aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e resultou em um ambiente uterino semelhante ao das resistentes

(FUMUSO et al., 2007). Com a finalidade de modular a resposta inflamatória uterina descoordenada das éguas suscetíveis, a corticoterapia tem sido proposta, com resultados satisfatórios nas taxas de prenhez, quando aplicada no período prévio à inseminação artificial (DELL'AQUA Jr. et al., 2006; PAPA et al., 2008) e melhora na qualidade do líquido intrauterino (BUCCA et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da corticoterapia aplicada em éguas na presença ou na ausência de um processo infeccioso uterino sobre a proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura.

## **Material e Métodos**

### *Animais*

Onze éguas suscetíveis à endometrite, com idade entre 4 a 30 anos, em fase cíclica e sadias clinicamente foram utilizadas no estudo. A classificação quanto à suscetibilidade foi realizada de acordo com Malschitzky et al. (2008). Para tal, as éguas foram inseminadas artificialmente com  $500 \times 10^6$  de espermatozoides diluídos em leite desnatado, num volume final de 20 mL. As éguas que apresentaram líquido intrauterino superior a 15 mm, verificado após exame ultrasonográfico 36 a 48 horas após a inseminação artificial, foram classificadas como suscetíveis. As éguas utilizadas, provenientes de um rebanho experimental, foram mantidas livres em poteiros e suplementadas com feno e aveia e água *ad libitum*.

### *Manejo reprodutivo*

As éguas foram sincronizadas com 5 mg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (Lutalyse<sup>®</sup>, Pfizer Saúde Animal, Paulínia, Brasil), com intervalo de 14 dias e avaliadas, através de palpação retal e ultrasonografia transretal. Após a observação dos sinais de estro, verificados por um folículo maior de 35 mm de diâmetro e edema uterino visível, as éguas foram submetidas a quatro tratamentos.

### *Tratamento Controle*

As éguas não foram submetidas a nenhum tratamento.

### *Tratamento Corticoterapia*

A aplicação intramuscular de 20 mg de acetato de isoflupredona (Predef<sup>®</sup>, Pfizer, Paulínia, Brasil) foi iniciada a cada 12 horas, por três dias consecutivos, quando a égua foi detectada em estro.

### *Infecção experimental*

A infusão de  $1 \times 10^9$  *Streptococcus zooepidemicus*/mL suspensas em 20 mL de solução salina a 0,9% foi realizada antisepticamente no dia da detecção do estro, com o uso de uma pipeta de inseminação (MATTOS et al., 1997).

### *Corticoterapia + Infecção experimental*

A corticoterapia e a infusão de *Streptococcus zooepidemicus* foram realizadas como descrito acima, sendo que as culturas bacterianas foram infundidas 24 horas após a primeira aplicação do glicocorticóide.

Todas as éguas foram submetidas aos quatro tratamentos e entre cada tratamento observou-se um intervalo mínimo de um ciclo estral. O primeiro estro utilizado foi o do grupo Controle, o terceiro estro o da corticoterapia (GC), o quinto estro o da infecção experimental (Infectado) e o sétimo estro o da corticoterapia + infecção experimental (GC + Infectado). Previamente a todas as manipulações transvaginais, a cauda das éguas foi ligada e a região perineal lavada com água, sabão neutro e degermante (Laboriodine<sup>®</sup>, Segmenta, Ribeirão Preto, Brasil) e seca com papel toalha. Ao final de cada infusão, as éguas foram tratadas com lavagens uterinas e infusão intrauterina de 10.000.000 UI de penicilina (Novapen, Marcolab, São João do Paraíso, Brasil).

### *Coleta das amostras*

Amostras de líquido endometrial puro foram coletadas 12 horas após o término de cada tratamento. Tampões vaginais comerciais (Mini OB<sup>®</sup>, Johnson & Johnson Industrial Ltda, São José dos Campos, Brasil) foram introduzidos anti-septicamente no útero, de acordo com o método de Reilas (2001), modificado por Malschitzky et al. (2008). O tampão foi introduzido pela cérvix, protegido por luvas de palpação, através do método

modificado de dupla luva. Foi cortada a parte distal de uma luva de palpação, para formar um tubo plástico e a mão enluvada com o tampão, foi introduzida no tubo plástico, fechando a extremidade com os dedos. O tubo plástico foi removido no momento da introdução do tampão, no útero, onde permaneceu por 30 minutos. O tampão foi removido protegido por uma luva de palpação e, imediatamente, foi inserido em um saco plástico estéril e pressionado, através de um dispositivo manual para a recuperação do líquido. O líquido coletado foi transferido para tubos cônicos estéreis e centrifugado, imediatamente, a 1.500 x g, por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para criotubos, em alíquotas de 2 mL, que foram estocadas no freezer a - 80 °C, até o uso.

#### *Eletroforese bi-dimensional*

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas, novamente a 10.000 x g, por 1 hora, a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado, alíquotado e estocado novamente em freezer a - 80 °C. A quantidade de proteína foi determinada, de acordo com o método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A eletroforese bi-dimensional foi realizada de acordo com O'Farrell et al. (1977), modificada por Rodnight et al. (1988), em duplicata.

#### *Primeira dimensão*

Para a focalização isoeétrica (primeira dimensão), foi realizada eletroforese em gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE) em gel de acrilamida a 3,5%. Os géis foram confeccionados em capilares de vidro de 150 x 2,5 mm de diâmetro interno. Para fazer 50 mL de gel (600µl por capilar) 27,6 g de uréia foi diluída em 15 mL de água ultra pura (Milli-Q<sup>®</sup>, Millisul, Porto Alegre, Brasil) a 60 °C. Após, foram adicionados 5,65 mL de acrilamida (solução estoque a 30%), 0,250 mL de anfólitos 2-4 (Servalyt<sup>®</sup>, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Alemanha), 0,250 mL de anfólitos pH 5-7 (Ampholine<sup>™</sup>, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), 2 mL de anfólitos pH 3-10 (Pharmalyte<sup>™</sup>, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), 1mL de Igepal (CA-630, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 0,083 mL de TEMED (TEMED 100%, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) e água ultra pura q.s.p. Imediatamente após a adição de persulfato de amônio a 10%, os capilares foram preenchidos com a solução do gel até 3,5 cm da

extremidade, através de sucção realizada através de uma seringa de 1 mL acoplada a um cilindro de látex, conectado na extremidade do capilar. Os géis permaneceram em banho-maria a 37 °C por 2 horas para polimerização. Foram aplicados 100 µg de proteína, por capilar, adicionados de uma solução de preparo da amostra (uréia a 9 M, lisina a 12,5 mM, SDS a 7 mM, Igepal a 4% e 2β-mercaptoetanol a 2%) e marcador de corrida (Cytochrome C, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A corrida foi realizada com um máximo de 800 V, 10 mA e 0,125 W por capilar, até que o marcador atingiu 8 cm de migração (2-3 horas). Os capilares foram identificados e estocados em freezer a -20 °C, até a segunda dimensão.

#### *Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

Para a realização da eletroforese de segunda dimensão, os géis da primeira dimensão foram retirados do capilar, com o uso de uma seringa de 5 mL acoplada a um tubo de látex, conectado em uma das extremidades do capilar. Através de aplicação de leve pressão, os géis foram expelidos dos capilares, 30 segundos após a retirada do capilar do freezer para breve descongelamento. Os géis foram colocados sob agitação em tampão de equilíbrio de SDS adicionado de 2β-mercaptoetanol por 20 minutos, em temperatura ambiente. Os géis de segunda dimensão foram confeccionados entre placas de vidro de 20 x 18 cm. A solução do gel de corrida SDS-PAGE continha 12% de acrilamida, 1% de SDS, 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8 e 10% de persulfato de amônio. O procedimento de confecção dos géis em placas de vidro é descrita por O'Farrell (1975). A corrida foi realizada com máximo de 125 V e 20 mA por placa, até que a corrida atingiu 3 cm do fim da placa (6-7 horas), verificado pelo marcador (Bromophenol Blue, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), adicionado ao tampão superior de corrida.

#### *Coloração e secagem*

Os géis foram corados durante a noite em uma solução de Comassie (Comassie Brilliant Blue R-250, Affymetrix / USB, Cleveland, EUA) a 0,15%, metanol a 53% e ácido acético glacial a 7%. Após, os géis foram descorados em solução fixadora (metanol a 53%, ácido acético glacial a 7%) sob agitação, pelo mínimo de 4 horas ou até obter transparência e equilibrados em solução de secagem (metanol a 50%, ácido acético glacial a 1%) por, aproximadamente, 2 horas. Os géis foram estocados entre duas lâminas de celofane,

escaneados (Hewlett-Packard 6100C, Palo Alto, EUA) e analisados por um *software* (Optiquant Acquisition & Analysis, 02.00, Canberra, Austrália) para a verificação da frequência e da densidade óptica relativa das bandas protéicas, medida em pixels. A medição é expressa pela porcentagem relativa de pixels, sendo que 100% representam o total de uma área definida, constante para cada gel e cada banda corresponde a uma porcentagem do total.

### *Espectrometria de Massa*

A identificação das proteínas foi realizada pela técnica de espectrometria de massa. As bandas protéicas de relevância estatística, quanto à densidade óptica relativa e à frequência foram recortadas do gel e digeridas com tripsina, de acordo com Shevchenko et al. (1996). O sequenciamento dos peptídeos foi realizado no Laboratório Uniprote-MS, do Centro de Biotecnologia da UFRGS, através do sistema de separação de partículas em escala nano (UPLC nanoACQUITY<sup>®</sup>, Waters, Milford, EUA), accoplado a um espectrômetro de massa (Q-TOF Micro<sup>™</sup>, Waters, Milford, EUA). As sequências obtidas foram comparadas para correspondência no banco de dados, disponíveis na internet, no sítio <http://www.matrixscience.com>.

### *Análise estatística*

Foi realizada análise de variância, com significância de 5%, para avaliação dos dados da densidade óptica relativa das bandas protéicas, associado ao teste de Tukey. Um mínimo de 2 géis de boa resolução por amostra foi analisado. A frequência relativa das bandas protéicas foi avaliada pelo teste Qui-quadrado, nos diferentes tratamentos.

## **Resultados**

A infusão intrauterina de *Streptococcus zooepidemicus* provocou uma endometrite clínica em todas as éguas, caracterizada pela observação de acúmulo de líquido intrauterino superior a 15 mm, através de ultrasonografia transretal realizada antes das coletas das amostras.

Foram analisados ao todo 102 géis de boa qualidade e resolução, identificando-se 72 bandas protéicas, com ponto isoelétrico (pI) entre 4,3 a 10,0 e peso molecular (PM) entre

15 a 105 kDa. Em 23 bandas protéicas, observou-se diferença em relação à densidade óptica relativa e à frequência, das quais 10 bandas foram identificadas (Tabela 2), através da espectrometria de massa. As outras 13 bandas protéicas não puderam ser identificadas, devido à quantidade insuficiente de proteína, que impossibilitou a realização da espectrometria de massa.

Tabela 2 – Proteínas identificadas pela espectrometria de massa, ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e a banda correspondente no gel 2D SDS-PAGE expressa em números arábicos.

Banda	Proteína	pI	PM (kDa)
3, 5, 7, 9	AAT	5,32	45-46,9
23	Hp	5,59	38,4
29	TT	5,36	35,8
53	ApoA-1	5,65	30,0
65	TF	6,83	78,0
77	IgG	6,53	37,5
87	Actina	5,29	41,7

AAT –  $\alpha_1$ -antitripsina, Hp – Haptoglobina, TT – Transtiretina, ApoA-1 – Apolipoproteína, A-1 TF – Transferrina.

Na tabela 3 estão descritas as bandas protéicas identificadas, que expressaram diferença significativa na densidade óptica relativa.

Tabela 3 – Densidade óptica relativa das bandas protéicas identificadas, nos diferentes tratamentos. Os valores representam a porcentagem relativa de pixels de cada banda, em relação à porcentagem da área total do gel.

Banda	Proteína	Controle	GC	Infectado	GC + Infectado
		%	%	%	%
3	AAT	3,07 <sup>a</sup>	3,36 <sup>a</sup>	3,05 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>
5	AAT	2,35 <sup>a</sup>	2,45 <sup>a</sup>	2,35 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>
7	AAT	2,40 <sup>a</sup>	2,54 <sup>a</sup>	2,43 <sup>a</sup>	4,21 <sup>b</sup>
9	AAT	2,45 <sup>a</sup>	2,57 <sup>a</sup>	2,83 <sup>a,b</sup>	4,53 <sup>b</sup>
23	Hp	3,51 <sup>a</sup>	3,83 <sup>a,b</sup>	4,58 <sup>b</sup>	7,84 <sup>a,b</sup>
29	TT	2,72 <sup>a</sup>	3,05 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	5,14 <sup>c</sup>
53	ApoA1	3,65 <sup>a</sup>	3,42 <sup>a</sup>	5,71 <sup>b</sup>	5,43 <sup>b</sup>
65	TF	15,83 <sup>a</sup>	16,43 <sup>a</sup>	10,91 <sup>b</sup>	10,78 <sup>b</sup>
77	IgG	1,71 <sup>a</sup>	1,87 <sup>a</sup>	4,51 <sup>b</sup>	2,18 <sup>a</sup>
87	Actina	4,31 <sup>a,b</sup>	3,21 <sup>a</sup>	3,32 <sup>a</sup>	6,69 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes, na mesma linha, indicam haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

AAT –  $\alpha_1$ -antitripsina, Hp – Haptoglobina, TT – Transtiretina, ApoA-1 – Apolipoproteína A-1, TF – Transferrina.



As bandas protéicas identificadas, que apresentaram diferença significativa na frequência estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Frequência relativa das bandas protéicas identificadas, nos diferentes tratamentos. Os valores indicam a porcentagem de aparecimento da banda no total de géis de cada tratamento.

Banda	Proteína	Controle	GC	Infectado	GC + Infectado
		%	%	%	%
3	AAT	92,8 <sup>a</sup>	67,7 <sup>b</sup>	40,9 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
5	AAT	89,3 <sup>a</sup>	67,7 <sup>a,b</sup>	40,9 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>
7	AAT	96,5 <sup>a</sup>	83,9 <sup>a</sup>	40,9 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>
9	AAT	89,3 <sup>a</sup>	77,4 <sup>a</sup>	31,8 <sup>b</sup>	65 <sup>a,b</sup>
29	TT	32,2 <sup>a</sup>	22,6 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	55 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes, na mesma linha, indicam haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

AAT –  $\alpha_1$ -antitripsina, TT – Transtiretina.

## Discussão

No presente trabalho foi verificada alteração na proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite, após a corticoterapia e após a infecção experimental bacteriana. A endometrite é bem descrita clinicamente na égua (MAISCHBERGER et al., 2008), mas pouco se sabe sobre as alterações imunológicas locais, que acompanham a endometrite (METTE et al., 2010). No presente estudo, foi verificado que a frequência e a densidade óptica relativa de várias proteínas da fase aguda (APP) da inflamação foram alteradas pelo estímulo infeccioso ou induzidas pelo tratamento com glicocorticóide. O estímulo inflamatório causado pela infecção induz o aumento na síntese das APP (CARAPETO et al., 2006) em poucas horas, alterando a síntese protéica drasticamente (GRUYS et al., 2006). Devido a isso, as APP têm sido muito utilizadas para monitorar processos inflamatórios e/ou infecciosos sistemicamente (ECKERSALL, 2004). Porém, o conhecimento sobre as alterações locais dessas APP é muito importante.

A corticoterapia aplicada nas éguas sem a presença de infecção não alterou a densidade óptica relativa de nenhuma, comparada ao controle. No entanto, na presença de infecção a corticoterapia provocou maiores alterações proteômicas, com aumento na densidade óptica relativa e na frequência relativa de AAT e TT, aumento na densidade óptica relativa de actina e diminuição na densidade óptica relativa de IgG. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os glicocorticóides inibem e também ativam vários genes pró e

anti-inflamatórios e muitas discrepâncias têm emergido (FRANCHIMONT et al., 1999). Eles podem possuir tanto efeito depressivo quanto estimulador, sendo que a resposta inflamatória aguda é um resultado dessas interações complexas e a ação dos glicocorticóides depende, em parte do tempo e do contexto de exposição celular (GALON et al., 2002).

Estudos *in vitro* demonstraram aumento na expressão de algumas APP (SAA, CRP e C3) por ação dos glicocorticóides (ZHANG et al., 2005; ZHANG et al., 2007). Porém, estes sozinhos possuem um efeito estimulador fraco sobre a maioria das APP, enquanto que agem fortemente em sinergia com citocinas (BAUMANN & GAULDIE, 1994), as quais são produzidas e liberadas, quando há um estímulo inflamatório, como a infecção (WEBEL et al., 1997). O aumento na frequência da TT induzida pela corticoterapia observada neste estudo, deve estar relacionado com a proteção do tecido inflamado, através do aporte de vitamina A. A TT possui papel importante no transporte dessa vitamina (CAMPBELL et al., 2005) e acredita-se que a ela seja necessária para a síntese de glicoproteínas (KIM & WOLF, 1974; WOLF et al., 1979). Isso pode ser um indicativo de que há síntese de APP no endométrio de éguas, uma vez que a maioria das APP são glicoproteínas (AISEN & LISTOWSKY, 1980; YOUNG et al., 1995; CERÓN et al., 2005; SMITH, 2005; CRISMAN et al., 2008), inclusive a AAT (TRAVIS & SALVESEN, 1983).

A AAT está presente no útero de éguas, com maior quantidade observada no estro que no diestro (SCUDAMORE et al., 1994). No presente estudo, a enzima AAT esteve presente em mais de 89% das éguas controle, mas a sua frequência diminuiu após a infecção uterina, chegando ao máximo de 40,9% das éguas. No entanto, a corticoterapia na presença de infecção aumentou a frequência da enzima, chegando a aparecer em até 100% dos casos e também aumentou sua expressão, quando comparada às éguas infectadas e aquelas em que a corticoterapia foi aplicada sem haver um processo infeccioso. Estes resultados sugerem uma forte indicação de que os glicocorticóides podem realmente aumentar a AAT nos processos infecciosos, quando há um estímulo que induz o aparecimento da enzima. Neste caso, o estímulo pode ser atribuído às proteases neutrófilicas (HADZIC et al., 2006), uma vez que a AAT é a principal enzima inibidora dessas proteases (GETTINS, 2002). Os neutrófilos migram da circulação sanguínea para os tecidos infectados, onde englobam e inativam bactérias, através da ação de um complexo de

substâncias contido em seus grânulos, incluindo as proteases como, por exemplo, a elastase (BRINKMANN et al., 2004). O equilíbrio antiprotease/elastase neutrofílica nos processos inflamatórios é muito importante, uma vez que o desequilíbrio favorece a proteólise descontrolada da última (POTEMPA et al., 1991). Devido a isso, a deficiência de AAT tem sido implicada como a responsável pelo desenvolvimento de doença pulmonar obstrutiva crônica em humanos (NITA et al., 2005) e cavalos (POTEMPA et al., 1991), pois o excesso de ação proteolítica é danosa aos tecidos. Da mesma forma sugere-se que o excesso de elastase neutrofílica seja responsável pelo dano permanente ao endométrio, incluindo a formação de fibrose periglandular, que é reconhecida como a causa de redução da fertilidade em éguas com episódios recorrentes de endometrite (SCUDAMORE et al., 1994).

Além da ação de antiprotease protetora, há evidências de que a AAT também possui efeitos anti-inflamatórios, já que o tratamento com esta enzima protege órgãos transplantados, que permanecem intactos (LEWIS et al., 2005) e aumenta os níveis de IL-10 (LEWIS et al., 2008) e IL-1Ra (CHURG et al., 2001; LEWIS et al., 2008), diminui o infiltrado celular (CHURG et al., 2001; LEWIS et al., 2005; NITA et al., 2005), a expressão de mediadores pró-inflamatórios (LEWIS et al., 2005; LEWIS et al., 2008), quimiotáticos (CHURG et al., 2001; NITA et al., 2005) e a liberação de outros componentes inflamatórios, como o óxido nítrico e moléculas de superfície MHC-II (LEWIS et al., 2005), além de inibir a produção de superóxidos pelos neutrófilos (BUCURENCI et al., 1992) e reduzir a letabilidade de endotoxinas bacterianas (JIE et al., 2003) e do TNF- $\alpha$  (LIBERT et al., 1996) *in vivo*.

A actina é o principal componente do citoesqueleto celular (HOSIE et al., 2008), presente em todas as células eucariotas (VAN TROYS et al., 1999). O citoesqueleto intacto é imprescindível para a motilidade e ativação celular (DE CLERCK et al., 1997). A remodelação da actina é necessária para a movimentação dos neutrófilos, já que a inibição da polimerização da actina bloqueia completamente a quimiotaxia. Devido à rápida reorganização da actina, os neutrófilos são capazes de orientar a sua migração e exibir movimento quimiotático, que facilita sua acumulação nos locais da injúria. A presença de actina pode ser um indicativo de dano local ou maior mobilidade dos neutrófilos (ZIGMOND, 1977). Há evidências recentes de que o rearranjo da actina pode ser chave,

durante a regulação da resposta inflamatória, através da diminuição na produção de óxido nítrico, liberação de prostaglandina E<sub>2</sub> e secreção de TNF- $\alpha$  (KIM et al., 2010). Portanto, o aumento de actina, AAT e TT e a diminuição de IgG observada neste estudo, possivelmente protege o endométrio contra os danos causados pelo metabolismo dos produtos da inflamação, demonstrando uma ação imunomoduladora dos glicocorticóides.

Neste estudo, foi verificado que o desafio intrauterino com *Streptococcus zooepidemicus* provocou o desaparecimento total da TT, em comparação a sua presença no grupo controle. Já a TF manteve-se presente e com frequência constante, mas sua densidade óptica relativa diminuiu, após a infecção em relação ao controle. A TT e a TF são consideradas APP negativas (CAMPBELL et al., 2005; GRUYS et al., 2005), que normalmente estão presentes nos animais sadios, mas suas concentrações irão decrescer na inflamação (TOUSSAINT et al., 2005). A diminuição de APP negativas ocorre devido à utilização de seus aminoácidos pelo fígado para a produção das APP positivas, cujas concentrações aumentam no processo inflamatório (CRISMAN et al., 2008).

A densidade óptica de Hp aumentou neste estudo, com o estímulo inflamatório causado pela infusão bacteriana. A Hp é uma APP positiva, cuja concentração aumenta no processo inflamatório (TAIRA et al., 1992), sugerindo que esta proteína participa, diretamente, na proteção dos tecidos. A principal e mais conhecida ação da Hp é prevenir a perda de ferro, através da formação de um complexo estável, a ligação com a hemoglobina (Hb) livre no sangue (PETERSEN et al., 2004). A Hp liga-se à Hb liberada por eritrócitos lesionados (HEEGAARD et al., 1998) e ajuda a aliviar os fatores danosos do ferro livre e a restringir a disponibilidade do metal para o crescimento bacteriano (TAIRA et al., 1992). Portanto, pode-se atribuir ações bacteriostática e anti-inflamatória à Hp (CERÓN et al., 2005).

A ApoA-1 é, normalmente, considerada uma APP negativa (CARPINTERO et al., 2005; SØRENSEN et al., 2005), no entanto foi verificado, neste estudo, aumento em sua densidade óptica relativa, após a infecção. Foi previamente demonstrada quantidade abundante de ApoA-1 em casos de artrite humana (BRESNIHAN et al., 2004) e uma capacidade inibitória desta APP sobre a ativação de monócitos e a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por células T (HYKA et al., 2001). Esses dados sugerem

efeitos anti-inflamatórios da ApoA-1, uma vez que o tratamento adjunto com esta proteína reduziu sinais de artrite e IL-1 $\beta$  (CHARLES-SCHOEMAN et al., 2008).

As éguas suscetíveis apresentam atraso na limpeza uterina, que pode ser atribuída a várias situações, incluindo alteração no mecanismo de defesa humoral e celular (ROGAN et al., 2007). Entretanto, neste estudo, foi observado aumento na densidade óptica relativa de IgG após a infecção bacteriana, indicando que a defesa uterina mediada por anticorpo não é prejudicada, nas éguas suscetíveis. Foi previamente demonstrado maiores concentrações de IgG e C3 no líquido endometrial de éguas suscetíveis (TROEDSSON et al., 1993; TROEDSSON, 1999) e maior número de células contendo IgG, IgA e IgM no líquido endometrial de éguas com diferentes graus de endometrite, em comparação ao de éguas genitalmente normais (WAELCHLI & WINDER, 1991). Estes dados indicam que outros fatores não-humorais devem estar envolvidos na resolução da endometrite (ROGAN et al., 2007).

A corticoterapia afetou a proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite, sendo os maiores efeitos vistos quando a corticoterapia foi aplicada na presença de um processo infeccioso. Os glicocorticóides estão envolvidos na modulação do processo inflamatório com efeitos anti-inflamatórios, como verificado pela diminuição de IgG e também estimuladores, como verificado pela indução do aumento de proteínas importantes como AAT, TT e actina, potencializando o mecanismo de defesa e de proteção do tecido inflamado. Sugere-se que a corticoterapia não prolongada, como a realizada neste estudo pode ser benéfica para o tratamento de processos infecciosos, assim como a terapia futura com AAT, através da inibição da formação de fibrose. Adicionalmente, foi observado que a infecção do lúmen uterino induziu uma alteração na proteômica do líquido endometrial, caracterizada pela variação de importantes APP, com aumento de Hp, ApoA-1 e IgG e diminuição de AAT, TF e TT.

### **Conflito de interesse**

Nenhum.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à equipe do Laboratório Uniprot, do Centro de Biotecnologia da UFRGS pela identificação das proteínas e ao CNPq pelo financiamento deste estudo.

### **Referências**

Aisen, P.; Listowsky, I. Iron transport and storage proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 357-393, 1980.

Alghamdi, A. S.; Foster, D. N.; Carlson, C. S.; Troedsson, M. H. T. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 230-237, 2005.

Baumann, H; Gauldie, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

Bresnihan, B.; Gogarty, M.; Fitzgerald, O.; Dayer, J. M.; Burger, D. Apolipoprotein A-I infiltration in rheumatoid arthritis synovial tissue: a control mechanism of cytokine production? **Arthritis Research Therapy**, v. 6, n. 6, p. 563-566, 2004.

Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D. S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532-1535, 2004.

Bucca, S.; Carli, A.; Buckley, T.; Dolci, G.; Fogarty, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, p. 1093-1100, 2008.

Bucurenci, N.; Blake, D. R.; Chidwick, K.; Winyard, P. G.: Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma alpha 1-antitrypsin. **FEBS Letters**, v. 300, p. 21-24, 1992.

Campbell, F. M.; Waterston, M. M.; Eckersall, P. D. Measuring the negative acute phase reactant transthyretin in porcine serum. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 72, 2005.

Carapeto, M. V.; Barrera, R.; Mañe, M. C.; Zaragoza, C. Serum  $\alpha$ -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. **Journal of Equine Veterinary Medicine**, v. 26, n. 3, p. 120-127, 2006.

Carpintero, R.; Alonso, C.; Iturralde, M.; Alava, M. A.; Piñeiro, A.; Lampreave, F. Acute phase protein response in pigs experimentally infected with African Swine Fever virus. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 25, 2005.

Cerón, J. J.; Eckersall, P. D.; Martínez-Subiela, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 85-99, 2005.

Charles-Schoeman, C.; Banquerigo, M. L.; Hama, S.; Navab, M.; Park, G. S.; Van Lenten, B. J.; Wagner, A. C.; Fogelman, A. W.; Brahn, E. Treatment with an polipoprotein A-1 mimetic peptide in combination with pravastatin inhibits collagen-induced arthritis. **Clinical Immunology**, v. 127, p. 234-244, 2008.

Churg, A.; Dai, J.; Zay, K.; Karsan, A.; Hendricks, R.; Yee, C.; Martin, R.; Mackenzie, R.; Xie, C.; Zhang, L.; Shapiro, S.; Wright, J. L. Alpha-1-Antitrypsin and a broad spectrum metalloprotease inhibitor, RS113456, have similar acute anti-inflammatory effects. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 8, p. 1119-1131, 2001.

Crisman, M. V.; Scarratt, W. K.; Zimmerman, K. L. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 24, p. 285-297, 2008.

De Clerck, L. S.; Mertens, A. V.; De Gendt, C. M.; Bridts, C. H.; Stevens, W. J. Actin polymerisation in neutrophils of rheumatoid arthritis patients in relation to treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Clinica Chimica Acta**, v. 261, p. 19-25, 1997.

Dell'Aqua Jr., J. A.; Papa, F. O.; Lopes, M. D.; Alvarenga, M. A.; Macedo, L. P.; Melo, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 270-273, 2006.

Eckersall, P. D. The time is right for acute phase protein assays. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 3-5, 2004.

Franchimont, D.; Martens, H.; Hagelstein, M. T.; Louis, E.; Dewe, W.; Chrousos, G. P.; Belaiche, J.; Geenen, V. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 2834-2839, 1999.

Fumuso, E.; Giguère, S.; Wade, J.; Rogan, D.; Videla-Dorna, I.; Bowden, R. A. Endometrial IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 31-41, 2003.

Fumuso, E.; Aguilar, J.; Giguère, S.; David, O.; Wade, J.; Rogan, D. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 282-285, 2006.

Fumuso, E. A.; Aguilar, J.; Giguère, S.; Rivulgo, M.; Wade, J.; Rogan, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis:



Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 30-39, 2007.

Galon, J.; Franchimont, D.; Hiroi, N.; Frey, G.; Boettner, A.; Ehrhart-Bornstein, M.; O'Shea, J. J.; Chrousos, G. P.; Bornstein, A. R. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 1, p. 61-71, 2002.

Gettins, P. G. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemistry Review**, 102, p. 4751-4803, 2002.

Gruys, E.; Toussaint, M. J. M.; Niewold, T. A.; Koopmans, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, v. 6B, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

Gruys, E.; Toussaint, M. J. M.; Niewold, T. A.; Koopmans, S. J.; Van Dijk, E.; Meloend, R. H. Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**, v. 108, p. 229-232, 2006.

Hadzic, R.; Nita, I.; Tassidis, H.; Riesbeck, K.; Wingren, A. J.; Janciauskiene, S.  $\alpha$ 1-Antitrypsin inhibits *Moraxella catarrhalis* MID protein-induced tonsillar B cell proliferation and IL-6 release. **Immunology Letters**, v. 102, p. 141-147, 2006.

Heegaard, P. M. H.; Klausen, J.; Nielsen, J. P.; González-Ramón, N.; Piñeiro, M.; Lampreave, F.; Alava, M. A. The porcine acute phase response to infection with *actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119b, n. 2, p. 365-373, 1998.

Hosie, M.; Adamson, M.; Penny, C. Actin binding protein expression is altered in uterine luminal epithelium by clomiphene citrate, a synthetic estrogen receptor modulator. **Theriogenology**, v. 69, p. 700-713, 2008.

Hyka, N.; Dayer, J. M.; Modoux, C.; Kohno, T.; Edwards III, C. K.; Roux-Lombard, P.; Burger, D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2381-2389, 2001.

Jie, Z.; Cai, Y.; Yang, W.; Jin, M.; Zhu, W.; Zhu, C. Protective effects of  $\alpha_1$ -antitrypsin on acute lung injury in rabbits induced by endotoxin. **Chinese Medical Journal**, v. 116, p. 1678-1682, 2003.

Kim, Y-C. L.; Wolf, G. Vitamin A deficiency and the glycoproteins of rat corneal epithelium. **The Journal of Nutrition**, v. 104, p. 710-718, 1974.

Kim, J. Y.; Lee, Y. G.; Kim, M-Y.; Byeon, S. U.; Rhee, M. H.; Park, J.; Katz, D. R.; Chain, B. M.; Cho, J. Y. Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 431-443, 2010.

Leblanc, M. M.; Neuwirth, L.; Jones, L.; Cage, C.; Mauragis, D. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. **Theriogenology**, v. 50, p. 49-54, 1998.

Lewis, E. C.; Shapiro, L.; Bowers, O. J.; Dinarello, C. A.  $\alpha_1$ -Antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102 n. 34 p. 12153-12158, 2005.

Lewis, E. C.; Mizrahi, M.; Toledano, M.; Defelice, N.; Wright, J. L.; Churg, A.; Shapiro, L.; Dinarello, C. A.  $\alpha_1$ -Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet

allograft transplantation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105 n. 42, p. 16236-16241, 2008.

Libert, C.; Van Molle, W.; Brouckaert, P.; Fiers, W. Alpha 1-antitrypsin inhibits the lethal response to TNF in mice. **The Journal of Immunology**, v. 157, p. 5126-5129, 1996.

Liu, I. K. M.; Troedsson, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. **Theriogenology**, v. 70, p. 415-420, 2008.

Lowry, O. H.; Rosebrough, J. W.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

Maischberger, E.; Irwin, J. A.; Carrington, S. D.; Duggan, V. E. Equine post-breeding endometritis: A review. **Irish Veterinary Journal**, v. 61, n. 3, p. 163-168, 2008.

Malschitzky, E.; Schilela, A.; Mattos, A. L. G.; Garbage, P.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. Intrauterine fluid accumulation during foal heat increases embryonic death. **Pferdeheilkunde**, v. 19, p. 246-249, 2003.

Malschitzky, E.; Fiala, S.; Esmeraldino, A. T.; Neves, A. P.; Garbade, P.; Jobim, M. I. M.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 74-78, 2008.

Mattos, R.; Castilho, L. F. F.; Malschitzky, E.; Neves, A. P.; Keller, A.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 521-524, 1997.

Mette, C.; Dooleweerdta, B. C.; Stineb, J.; Miki, B. A.; Roenna, P.M.; Henrika, L-J. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, p. 95-105, 2010.

Nita, I.; Hollander, C.; Westin, U.; Janciauskiene, S. M. Prolastin, a pharmaceutical preparation of purified human  $\alpha$ 1-antitrypsin, blocks endotoxin-mediated cytokine release. **Respiratory Research**, v. 6, p. 12-23, 2005.

O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

O'Farrell, P. Z.; Goodman, H. M.; O'Farrell, P. H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, v. 12, p. 1133-1142, 1977.

Papa, F. O.; Dell'Aqua Jr., J. A.; Alvarenga, M. A.; Melo, C. M.; Zahn, F. S.; Lopes, M. D. Use of corticosteroid therapy on the modulation of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen semen. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 79-82, 2008.

Petersen, H. H.; Nielsen, J. P.; Heegaard, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research** v. 35, p. 163-187, 2004.

Potempa, J.; Wunderlich, J. K.; Travis, J. Comparative properties of three functionally different but structurally related serpin variants from horse plasma. **Biochemistry Journal**, v. 274, p. 465-471, 1991.

Reilas, T. Uterine luminal environment of the mare. **Academic dissertation**, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 391p, 2001.

Rodnight, R.; Zamani, R.; Tweedale, A. An investigation of experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 24, p. 27-38, 1988.

Rogan, D.; Fumuso, E.; Rodríguez, E.; Wade, J.; Sánchez Bruni, S. F. Use of a mycobacterial cell wall extract (MCWE) in susceptible mares to clear experimentally

induced endometritis with *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 3, p. 112-117, 2007.

Scudamore, C. L.; Pemberton, A. D.; Miller, H. R. P.; McDonnel, A. M.; Thomson, S. R. M. Measurement by ELISA of equine alpha-1-protease inhibitor in uterine flushings from mares. **Research in Veterinary Science**, v. 57, p. 45-52, 1994.

Smith, K. The glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein – structurally complex, functionally important? In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 8, 2005.

Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver- stained polyacrilamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

Sørensen, N. S.; Tegtmeier, C.; Andersen, L. O.; Piñeiro, M.; Toussaint, M. J. M.; Campbell, F. M.; Heegaard, P. M. H. The porcine acute phase protein response to experimental *Streptococcus suis* infection. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p.33, 2005.

Taira, T.; Fujinaga, T.; Okumura, M.; Yamashita, K.; Tsunoda, N.; Mizuno, S. Equine haptoglobin: isolation, characterization and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, p. 435-442, 1992.

Toussaint, M. J. M.; Campbell, F. M.; Piñeiro, M.; Gruys, E. Measuring negative acute phase proteins to assess acute phase response and starvation. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 14, 2005.

- Travis, J.; Salvesen, G. Human plasma proteinase inhibitors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 655-709, 1983.
- Troedsson, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-471, 1999.
- Troedsson, M. H. T.; Liu, I. K. M. Uterine clearance of non-antigenic markers Cr in response to bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 44, p. 283-288, 1991.
- Troedsson, M. H. T.; Liu, I. K. M.; Thurmond, M. Immunoglobulin IgG and IgA and complement C3 concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 502-506, 1993.
- Van Troys, M.; Vandekerckhove, J.; Ampe, C. Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1448, p. 323-348, 1999.
- Young, C.R.; Eckersall, P.D.; Saini, P.K.; Stanker, L.H. Validation of immunoassays for bovine haptoglobin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 49, p. 1-13, 1995.
- Waelchli, R. O.; Winder, N. C. Mononuclear cell infiltration of the equine endometrium: immunohistochemical studies. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 6, p. 470-474, 1991.
- Webel, D. M.; Finck, B. N.; Baker, D. H.; Johnson, R. W. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide, **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1514-1520, 1997.

Wolf, G.; Kiorpes, T. C.; Masushige, S.; Schreiber, J. B.; Smith, M. J.; Anderson, R. S. Recent evidence for the participation of vitamin A in glycoprotein synthesis. **Federation Proceedings**, v. 38, n. 11, p. 2540-2543, 1979.

Zent, W. W.; Troedsson, M. H. T.; Xue, J-L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: A field study. In: **Proceedings of the Annual Meeting for The Society for Theriogenology**, 78-79, 1998.

Zhang, N.; Truong-Tran, Q. A.; Schleimer, R. P. Selective effects of glucocorticoids on epithelial responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, p. S12, 2005.

Zhang, N.; Troung-Tran, Q. A.; Tancowny, B.; Harris, K. E.; Schleimer, R. P. Glucocorticoids Enhance or Spare Innate Immunity: Effects in Airway Epithelium Are Mediated by CCAAT/Enhancer Binding Proteins. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 578-589, 2007.

Zigmond, S. H. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. **Journal of Cell Biology**, v. 75, p. 606-616, 1977.

**3.2. Artigo 3.** Enviado para publicação no periódico *Pferdeheilkunde*.

**Níveis de óxido nítrico em amostras uterinas de éguas suscetíveis após a corticoterapia**

Caroline Antoniazzi Wolf<sup>1,2\*</sup>, Eduardo Malschitzky<sup>3</sup>, Ivan Cunha Bustamante-Filho<sup>1,2</sup>,  
Maria Inês Mascarenhas Jobim<sup>2</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>1,4</sup>

*1 – Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS*

*2 – Laboratório de Tecnologia de Sêmen e Proteínas relacionadas à Reprodução Animal,  
Faculdade de Veterinária, UFRGS*

*3 – Curso de Medicina Veterinária, ULBRA*

*4 – Pesquisador do CNPq*

**Resumo**

Apesar de contínua pesquisa, a causa da suscetibilidade a um dos principais problemas do trato reprodutivo equino, a endometrite persistente pós-cobertura, continua desconhecida. Acredita-se que falha no sistema imune das éguas suscetíveis faz com elas não consigam eliminar a inflamação. A corticoterapia tem sido proposta para modular o processo inflamatório descoordenado, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios potentes. O óxido nítrico, um mediador inflamatório, que causa o relaxamento da musculatura lisa, está sendo sugerido como um dos fatores predisponentes à suscetibilidade. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da corticoterapia sobre a concentração de óxido nítrico em lavados uterinos de éguas suscetíveis à endometrite. Foram coletadas amostras de lavados do útero de onze éguas, após infecção bacteriana uterina e/ou corticoterapia realizada por 3 dias consecutivos. Não foi observada diferença significativa na concentração de óxido nítrico, verificada pela análise de regressão. A corticoterapia aplicada neste estudo não alterou a concentração de óxido nítrico nos lavados uterinos de éguas suscetíveis.

**Palavras-chave:** endometrite, égua, glicocorticóide, óxido nítrico.

\* Autora para correspondência. Email: [cvetwolf@yahoo.com.br](mailto:cvetwolf@yahoo.com.br)  
Tel: +55(51)9824-6875



### *Nitric oxide levels in uterine samples from susceptible mares after corticotherapy*

#### **Abstract**

*Despite of continuous research, the cause of the susceptibility to one of the major disorders of the female equine reproductive tract, persistent post-mating endometritis, is still unknown. It is believed that failure in the immune system of susceptible mares makes them unable to clean inflammation. Corticotherapy has been proposed to modulate the impaired inflammatory process, due to its anti-inflammatory actions. Nitric oxide, an inflammatory mediator, which causes smooth muscle relaxation, has been suggested as one of the predisposing factors to susceptibility. The objective of this study was to verify the effect of corticotherapy on the nitric oxide levels in uterine flushings from mares susceptible to endometritis. Uterine flushing samples from 11 mares were collected, after uterine bacterial infection and/or corticotherapy performed for 3 consecutive days. It was not observed significative difference on the nitric oxide concentration, verified by regression analysis. The corticotherapy administered in this study did not affect the nitric oxide concentration in uterine flushings from susceptible mares.*

**Keywords:** *endometritis, mare, glucocorticoid, nitric oxide.*

#### **Introdução**

A endometrite (HURTGEN, 2006) é uma consequência natural da cobertura e resulta na contaminação de bactérias e de sêmen no útero equino (RIGBY et al., 2001). A égua sadia resolve a inflamação em 48 horas (KATILA, 1996), para que o ambiente uterino esteja apto a receber o embrião (TROEDSSON, 2006). No entanto, um estudo de campo demonstrou que 15% das éguas desenvolveram uma endometrite persistente após a cobertura (ZENT et al., 1998). A endometrite persistente pós-cobertura causa uma redução substancial na fertilidade das éguas, uma vez que a taxa de morte embrionária é três vezes maior naquelas que apresentam essa condição (MALSCHITZKY et al., 2003). Apesar de bastante estudada, ainda não se sabe a causa da suscetibilidade à endometrite (ALGHAMDI & TROEDSSON, 2002). Para diagnosticar e tratar esta condição é necessário identificar os fatores predisponentes e que desafiam o trato reprodutivo da égua (HURTGEN, 2006). O

atraso na limpeza uterina tem sido atribuído como um fator de importante contribuição (GUTJAHR et al., 2000), sendo demonstrado que as éguas suscetíveis apresentam o padrão de contração miometral deficiente (TROEDSSON et al., 1993). O atraso na limpeza uterina é caracterizado por acúmulo de líquido, após a cobertura (GUTJAHR et al., 2000) e dos produtos da inflamação (TROEDSSON & LIU, 1991), dentre eles o óxido nítrico produzido e liberado no processo inflamatório (ALGHAMDI et al., 2005).

O óxido nítrico é um radical livre e gasoso (FREAN et al., 1997) de vida muito curta (D'ACQUISTO et al., 1997), 3 a 5 segundos (RODEBERG et al., 1995). Esse gás causa o relaxamento da musculatura lisa (D'ACQUISTO et al., 1997) e é sintetizado por várias células mamíferas (RODEBERG et al., 1995), incluindo células do sistema nervoso, vascular e imune (ABU-SOUD & STUEHR, 1993). A síntese ocorre por oxidação do aminoácido L-arginina (RODEBERG et al., 1995; STUEHR, 1999), através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A enzima NOS converte o terminal do grupo guanina do L-arginina em óxido nítrico (RODEBERG et al., 1995). A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), uma das três isoformas da enzima, produz grande quantidade de óxido nítrico (FREAN et al., 1997; EKERHOVD et al., 2000), porém não é, normalmente, expressada a não ser que seja estimulada por citocinas. A iNOS está presente no útero de camundongos nos estágios de pré e peri-implantação embrionária (SAXENA et al., 2000) e de éguas resistentes e suscetíveis à endometrite (ALGHAMDI et al., 2005).

Os glicocorticóides são anti-inflamatórios e imunomoduladores reconhecidos (RASMUSSEN et al., 1998; BOSSCHER et al., 2000; PACE et al., 2007). A modulação da resposta inflamatória, através da corticoterapia está sendo proposta como eficaz para o tratamento da endometrite, através da diminuição de acúmulo de líquido no útero (BUCCA et al., 2008) e melhora nas taxas de prenhez (DELL'AQUA Jr. et al., 2006; PAPA et al., 2008). Foi demonstrado que os glicocorticóides inibem a produção de óxido nítrico em vários tipos de células e reduzem os níveis de mRNA para iNOS (SHINODA et al., 2003; PUDRITH et al., 2010). A dexametasona reduz a formação de nitrito, um dos produtos estáveis finais da síntese de óxido nítrico e inibe a expressão de mRNA da iNOS de 10% (SHINODA et al., 2003) a 50% (WALKER et al., 1997), devido à inibição na expressão gênica da iNOS (D'ACQUISTO et al., 1997). A nossa hipótese é que a corticoterapia reduz

os níveis de óxido nítrico uterino, proporcionando uma melhora na contração miometral e na limpeza uterina das éguas suscetíveis.

O objetivo deste estudo é verificar o efeito da corticoterapia sobre os níveis de óxido nítrico em amostras uterinas de éguas suscetíveis à endometrite.

## **Material e Métodos**

### *Animais*

Onze éguas suscetíveis à endometrite, com idade entre 4 a 30 anos, sadias em fase cíclica foram utilizadas no estudo. A classificação, quanto à suscetibilidade foi realizada, de acordo com Malschitzky et al. (2008). Para tal, as éguas foram inseminadas artificialmente, com  $500 \times 10^6$  de espermatozoides diluídos em leite desnatado, num volume final de 20 mL. As éguas que apresentaram líquido intrauterino superior a 15 mm, verificado após exame ultrasonográfico 36 a 48 horas após a inseminação artificial, foram classificadas como suscetíveis. As éguas utilizadas, provenientes de um rebanho experimental, foram mantidas livres em poteiros e suplementadas com feno e aveia e água *ad libitum*.

### *Manejo reprodutivo*

As éguas foram sincronizadas com 5 mg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (Lutalyse<sup>®</sup>, Pfizer Saúde Animal, Paulínia, Brasil), com intervalo de 14 dias e avaliadas, através de palpação retal e ultrasonografia transretal. Após a observação dos sinais de estro, verificados pela presença de um folículo com mais de 35 mm de diâmetro e edema uterino visível, as éguas foram submetidas a quatro tratamentos, descritos abaixo:

### *Tratamento Controle*

As éguas não foram submetidas a nenhum tratamento.

### *Tratamento Corticoterapia*

A aplicação intramuscular de 20 mg de acetato de isoflupredona (Predef<sup>®</sup>, Pfizer, Paulínia, Brasil) foi iniciada a cada 12 horas, por 3 dias consecutivos, quando a égua foi detectada em estro.

### *Infecção experimental*

A infusão de  $1 \times 10^9$  *Streptococcus zooepidemicus*/mL suspensas em 20 mL de solução salina a 0,9% foi realizada antissépticamente no dia da detecção do estro, com o uso de uma pipeta de inseminação (MATTOS et al., 1997).

### *Corticoterapia + Infecção experimental*

A corticoterapia e a infusão de *Streptococcus zooepidemicus* foram realizadas como descrito acima, sendo que as culturas bacterianas foram infundidas 24 horas após a primeira aplicação do glicocorticóide.

Todas as éguas foram submetidas aos quatro tratamentos e entre cada tratamento observou-se um intervalo mínimo de um ciclo estral. O primeiro estro utilizado foi o do grupo Controle, o terceiro estro o da corticoterapia (GC), o quinto estro o da infecção experimental (Infectado) e o sétimo estro o da corticoterapia + infecção experimental (GC + Infectado). Previamente a todas as manipulações transvaginais, a cauda das éguas foi ligada e a região perineal lavada com água, sabão neutro e degermante (Laboriodine<sup>®</sup>, Segmenta, Ribeirão Preto, Brasil) e seca com papel toalha. Ao final de cada infusão, as éguas foram tratadas com lavagens uterinas sucessivas e infusão intrauterina de 10.000.000 UI de penicilina (Novapen, Marcolab, São João do Paraíso, Brasil).

### *Coleta das amostras*

As amostras foram coletadas 12 horas após o final de cada tratamento. Para realizar os lavados uterinos, infundiu-se 100 mL de solução de ringer lactato, por via cervical com o uso de um cateter de Foley (2w30cc24F, Rüsck, Alemanha). Após, o útero foi massageado por via transretal para distribuição uniforme do líquido recuperado por gravidade. O líquido do lavado foi centrifugado a  $1.500 \times g$  por 20 minutos para retirar as células existentes e o sobrenadante congelado e estocado em freezer a  $-80^\circ\text{C}$ , até o uso.

### *Determinação do óxido nítrico*

As amostras de lavados uterinos foram descongeladas para determinação da concentração do óxido nítrico, através de um kit comercial disponível (Catálogo n<sup>o</sup> 917-

010, Stressgen<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante. O nitrato é reduzido a nitrito, cuja concentração foi determinada em um espectrofotômetro, após a adição do reagente de Griess. A leitura foi realizada em absorbância a 540nm e após foi realizado o cálculo da concentração, utilizando uma curva padrão ( $R^2 = 0,9899$ ).

#### *Análise estatística*

Os resultados das concentrações de óxido nítrico nas amostras dos diferentes tratamentos foram submetidos à análise de variância, com nível de significância de 5%.

### **Resultados**

A concentração de óxido nítrico foi determinada em  $\mu\text{mol/L}$ . As médias observadas nos tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si ( $P=0,43$ ) e estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Média e erro padrão da concentração do óxido nítrico nos lavados uterinos nos quatro tratamentos.

<b>Tratamentos</b>	<b>Média de óxido nítrico (<math>\mu\text{mol/L}</math>) <math>\pm</math> erro padrão</b>
Controle	46,5 <sup>a</sup> $\pm$ 13,22
GC	66,31 <sup>a</sup> $\pm$ 44,19
Infectado	25,68 <sup>a</sup> $\pm$ 10,93
Infectado + GC	17,3 <sup>a</sup> $\pm$ 8,31

<sup>a</sup>Letras iguais na coluna representam não haver diferença significativa ( $p>0,05$ ).

### **Discussão**

Os resultados do presente estudo demonstram que a corticoterapia realizada por três dias não provocou alteração na concentração de óxido nítrico nos lavados uterinos coletados, após a corticoterapia na presença ou ausência de infecção uterina. Estes resultados estão de acordo com Fioratti et al. (2010), que não observaram diferença significativa na concentração de óxido nítrico, com a administração em dose única de um glicocorticóide, após inseminação artificial, tanto em éguas suscetíveis, quanto resistentes. Os glicocorticóides são muito utilizados pelos seus efeitos anti-inflamatório e imunodepressivo (FANG et al., 1997), no entanto efeitos pró-inflamatórios tem sido

atribuídos a esses agentes e discrepâncias têm surgido em relação a sua ação (FRANCHIMONT et al., 1999). Alguns estudos demonstraram que os glicocorticóides aumentam a produção de óxido nítrico (YUKAWA et al., 2005), enquanto que outros demonstraram que eles inibem a expressão de iNOS (WALKER et al., 1997; SHINODA et al., 2003), diminuindo a produção de óxido nítrico. Os efeitos duplos dos glicocorticóides podem apresentar vantagens e desvantagens, por exemplo, o aumento de óxido nítrico induzido por dexametazona é benéfico ao prevenir a vasoconstrição renal (BOBADILLA et al., 1999), enquanto que a diminuição é maléfica ao agravar a hipertensão, um dos efeitos colaterais da administração de glicocorticóide (WALLERATH et al., 1999). Estes efeitos controversos indicam uma ação complexa dos glicocorticóides que, provavelmente, depende do contexto em que ele é inserido. Wolf et al. (2011), observaram que os glicocorticóides agem através de um efeito imunomodulador, podendo inibir ou estimular proteínas inflamatórias no endométrio equino, principalmente quando aplicados na presença de inflamação. De qualquer forma, a corticoterapia realizada neste estudo não alterou os níveis de óxido nítrico nos lavados uterinos, entretanto as éguas apresentaram uma variação individual muito grande, como verificado pelo erro padrão alto nos grupos.

Os efeitos benéficos da corticoterapia observados em estudos anteriores nas taxas de prenhez, provavelmente não foram causados pela diminuição de óxido nítrico uterino.

### **Conflito de interesse**

Nenhum.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro.

### **Referências**

Abu-Soud, H. M.; Stuehr, D. J. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 90, p.10769-10772, 1993.

Alghamdi, A. S.; Troedsson, M. H. T. Concentration in nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis. **Theriogenology**, v. 58, p.445-448, 2002.

Alghamdi, A. S.; Foster, D. N.; Carlson, C. S.; Troedsson, M. H. T. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 230-237, 2005.

Bobadilla, N.A.; Tapia, E.; Jiménez, F.; Sánchez-Lozada, L. G.; Santamaria, J.; Monjardín, A.; Bolio, A.; Gambá, G.; Herrera-acosta, J. Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. F464-471, 1999.

Bosscher, K. D.; Berghe, W. V.; Haegeman, G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, p. 16-22, 2000.

Bucca, S.; Carli, A.; Buckley, T.; Dolci, G.; Fogarty, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, p. 1093-1100, 2008.

D'acquisto, F.; Cicatiello, L.; Iuvone, T.; Ialenti, A.; Ianaro, A.; Esumi, H.; Weisz, A.; Carnucestro, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression by glucocorticoid-induced protein(s) in lipopolysaccharide-stimulated J774 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 339, p. 87-95, 1997.

Dell'Aqua Jr., J. A.; Papa, F. O.; Lopes, M. D.; Alvarenga, M. A.; Macedo, L. P.; Melo, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 270-273, 2006.

Ekerhovd, E.; Brännström, M.; Weijdegård, B.; Norström, A. Nitric oxide synthases in the human cervix at term pregnancy and effects of nitric oxide on cervical smooth muscle contractility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 83, n. 3, p. 610-616, 2000.

Fang, L.; Zhang, Y.; Lehmann, J.; Wang, Y.; Ji, H.; Ding, D. Design and synthesis of furoxan-based nitric oxide-releasing glucocorticoid derivatives with potent anti-inflammatory activity and improved safety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 1062–1066, 2007.

Fioratti, E. G.; Villaverde, A. I. S. B.; Avanzi, B. R.; Leal, A. C. M. S.; Caldas-Bussieri, M. C.; Alvarenga, M. A. Nitric oxide concentration in free uterine fluid after dexamethasone treatment of mares resistant and susceptible to endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. S121, p. S113-S114, 2010.

Franchimont, D.; Martens, H.; Hagelstein, M. T.; Louis, E.; Dewe, W.; Chrousos, G. P.; Belaiche, J.; Geenen, V. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 2834-2839, 1999.

Frean, S. P.; Bryant, C. E.; Fröling, I-L.; ElliotT, J.; Lees, P. Nitric oxide production by equine articular cells *in vitro*. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 2, p. 98-102, 1997.

Gutjahr, S.; Paccamonti, D. L.; Pycocock, J. F.; Taverne, M. A.; Dieleman, S. J.; Van Der Weijden, G. C. Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mares. **Theriogenology**, v. 54, p. 447-456, 2000.

Hurtgen, J. P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. **Theriogenology**, v. 66, p. 560-566, 2006.



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

Malschitzky, E.; Schilela, A.; Mattos, A. L. G.; Garbade, P.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. Intrauterine fluid accumulation during foal heat increases embryonic death. **Pferdeheilkunde**, v. 19, p. 246-249, 2003.

Malschitzky, E.; Fiala, S.; Esmeraldino, A. T.; Neves, A. P.; Garbade, P.; Jobim, M. I. M.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 74-78, 2008.

Mattos, R.; Castilho, L. F. F.; Malschitzky, E.; Neves, A. P.; Keller, A.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 521-524, 1997.

Pace, T. W. W.; Hu, F.; Miller, A. H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, p.9-19, 2007.

Papa, F. O.; Dell'Aqua Jr., J. A.; Alvarenga, M. A.; Melo, C. M.; Zahn, F. S.; Lopes, M. D. Use of corticosteroid therapy on the modulation of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen semen. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 79-82, 2008.

Pudrith, C.; Martin, D.; Kim, Y. H.; Jhang, P.; Kim, B.; Wall, M.; Jung, T. Glucocorticoids reduce nitric oxide concentration in middle ear effusion from lipopolysaccharide induced otitis media. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 74, p. 384-386, 2010.

Rasmussen, S.; Larsena, A. S.; Thomsena, S. T.; Kehlert H. Intra-articular glucocorticoid, bupivacaine and morphine reduces pain, inflammatory response and convalescence after arthroscopic meniscectomy. **Pain**, v. 78, p. 131-134, 1998.

Rigby, S. L.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Colleran, P.; Thompson, J. A.; Varner, D. D.; Blanchard, T. L.; Brinsko, S. P.; Taylor, T.; Wilkerson, M. K.; Delp, M. D. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 740-747, 2001.

Rodeberg, D. A.; Chaet, M. S.; Bass, R. C.; Arkovitz, M. S.; Garcia, V. F. Nitric oxide: An overview. **The American Journal of Surgery**, v. 170, p. 292-303, 1995.

Saxena, D.; Purohit, S. B.; Kumar, P. G.; Laloraya, M. Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at implantation. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 384-391, 2000.

Shinoda, J.; Mclaughlin, K. E.; Bell, H. S.; Swaroop, G. R.; Yamaguchi, S-I.; Holmes, M. C.; Whittle, A. R. Molecular mechanisms underlying dexamethasone inhibition of iNOS expression and activity in C6 glioma cells. **GLIA**, v. 42, p. 68-76, 2003.

Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 217-230, 1999.

Troedsson, M. H. T. Breeding-induced endometritis in mares. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 22, p. 705-712, 2006.

Troedsson, M. H. T.; Liu, I. K. M. Uterine clearance of non-antigenic markers Cr in response to bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 44, p. 283-288, 1991.

Troedsson, M. H.; Liu, I. K.; Ing, M.; Pascoe, J.; Thurmond, M. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 307-313, 1993.

Walker, G.; Pfeilschifter, J.; Kunz, D. Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-g-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n.26, p. 16679-16687, 1997.

Wallerath, T.; Witte, K.; Schäfer, S. C.; Schwarz, P. M.; Prellwitz, W.; Wohlfart, P.; Kleinert, H.; Lehr, H. A.; Lemmer, B.; Förstermann, U. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 13357-13362, 1999.

Wolf, C. A.; Malschitzky, E.; Jobim, M. I. M.; Mattos, R. C. Effect of corticotherapy on the proteomics of the endometrial fluid from mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Enviado para publicação**, 2011.

Yukawa, H.; Shen, J.; Harada, N.; Cho-Tamaoka, H.; Yamashita, T. Acute effects of glucocorticoids on atp-induced  $ca^{2+}$  mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 130, p. 485-496, 2005.

Zent, W. W.; Troedsson, M. H. T.; Xue, J-L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: A field study. In: **Proceedings of the Annual Meeting for The Society for Theriogenology**, 78-79, 1998.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Utilizando uma abordagem proteômica, foi possível verificar o efeito da corticoterapia no líquido endometrial de éguas suscetíveis, sendo as maiores alterações observadas quando a corticoterapia foi aplicada na presença de infecção, do que na ausência. Foi verificado que os glicocorticóides possuem ações duplas, tanto pró quanto anti-inflamatórias, indicando uma ação imunomoduladora, que representa o resultado de interações complexas entre estes agentes e o organismo. Esta ação depende do tempo e do contexto em que o glicocorticóide é inserido. De qualquer forma, o entendimento exato destes efeitos duplos permanece sem ser esclarecido e por isso, as proteínas identificadas neste estudo devem ser utilizadas em conjunto com a corticoterapia, como um método repetitivo, que possibilitará um melhor entendimento de tais efeitos, sejam depressivos ou estimuladores.

Foi possível, também, verificar as alterações protéicas locais que ocorrem no processo inflamatório/infeccioso do lúmen uterino, a endometrite. Foi verificado que a infecção provocou aumento e diminuição de várias proteínas importantes envolvidas na inflamação. A identidade dessas proteínas é muito importante, pois sugere que elas desempenham funções diversas, incluindo propriedades anti-inflamatórias e de defesa do endométrio. Uma vez elucidados os papéis dessas proteínas, pode-se obter marcadores da endometrite persistente, da suscetibilidade a este problema reprodutivo ou ainda da causa, que continua não esclarecida.

Permanecem, portanto, inúmeras portas abertas à pesquisa para esclarecer os mecanismos de defesa uterinos e as interações entre estes mecanismos com os agentes imunomoduladores e definir as alterações imunológicas endometriais, que possibilitam uma melhor interpretação da fisiopatologia e da suscetibilidade à endometrite persistente pós-cobertura. Tal entendimento representa um passo importante, para o desenvolvimento de novas terapias para esta patologia. As pesquisas serão aprimoradas, através de comparações sistêmicas e marcação de proteínas relevantes, para a utilização como tratamento alternativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SOUD, H. M.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 90, p.10769-10772, 1993.

ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p. 445-454, 1987.

AISEN, P. Transferrins, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. In: Sigel, A; Sigel, H. **Metal in Biological Systems**. New York: Marcel Dekker, v. 35, p. 585-665, 1988.

AISEN, P.; LISTOWSKY, I. Iron transport and storage proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 357-393, 1980.

ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI-REZAI, S.; ABSHENAS, J. A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: A comparison with the serum proteins. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 10-20, 2006.

ALDRED, A. R.; DICKSON, P. W.; MARLEY, P. D.; SCHREIBER, G. Distribution of transferrin synthesis in brain and other tissues in the rat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 11, p. 5293-5297, 1987.

ALGHAMDI, A. S.; TROEDSSON, M. H. T. Concentration in nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis. **Theriogenology**, v. 58, p.445-448, 2002.

ALGHAMDI, A. S.; TROEDSSON, M. H. T.; LASCHKEWITSCH, T.; XUE, J. L. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics *in vitro*. **Theriogenology**, v. 55, p. 1019-1028, 2001.

ALGHAMDI, A. S.; FOSTER, D. N.; CARLSON, C. S.; TROEDSSON, M. H. T. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 230-237, 2005.

ANDERSEN, S. A.; PETERSEN, H. H.; ERSBØLL, A. K.; FALK-RØNNE, J.; JENSEN, A. L.; JACOBSEN, S. Equine serum amyloid A response following vaccination against influenza and tetanus. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 36, 2005.

ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y.; SUMIYOSHI, K.; HODOHARA, K.; OKABE, H.; OCHI, Y.; BAMBA, T.; BROWN, W. R. Modulation of complement C3, C4, and factor B production in human intestinal epithelial cells: differential effects of TNF-, IFN- $\gamma$ , and IL-4. **Pathophysiology**, v. 2, p. 251-259, 1995.

ARNOLD, R. R.; COLE, M. F.; MCGHEE, I. R. A bactericidal effect for human lactoferrin. **Science**, v. 197, p. 263-65, 1977.

ARNOLD, R. R.; BREWER, M.; GAUTHIER, J. J. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. **Infection and Immunity**, v. 28, n. 3, p. 893-898, 1980.

ASBURY, A. C.; GORMAN, N. T.; FOSTER, G.W. Uterine defense mechanisms in the mare: serum opsonins affecting phagocytosis of *Streptococcus zooepidemicus* by equine neutrophils. **Theriogenology**, v. 21, p. 375-385, 1984.

BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M.; MANTECA, X.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; GIMENEZ, M.; SACO, Y.; BASSOLS, A. Evaluation of acute phase proteins as potential indicators of social stress in dairy cattle. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 55, 2005.

BANKS, R. E.; FORBES, M. A.; STORR, M.; HIGGINSON, J.; THOMPSON, D.; RAYNES, J.; ILLINGWORTH, J. M.; PERREN, T. J.; SELBY, P. J.; WHICHER, J. T. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. **Clinical Experimental Immunology**, v. 102, p. 217-223, 1995.

BARNES, P. J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, p. 76-85, 2010.

BAUMANN, H; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

BAUMANN, H.; RICHARDS, C.; GAULDIE, J. Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin-1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 12, p. 4122-4128, 1987.

BELL, S. A.; FAUST, H.; SCHMID, A.; MEURER, M. Autoantibodies to C-reactive protein (CRP) and other acute-phase proteins in systemic autoimmune diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, p. 327-332, 1998.

BENGTSSON, T.; DAHLGREN, C.; STENDAHL, O.; ANDERSSON, T. Actin assembly and regulation of neutrophil function: effects of cytochalasin B and tetracaine on chemotactic peptide-induced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and degranulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 49, n. 3, p. 236-244, 1991.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 64-102, 1996.

BERGQUIST, J.; HAKANSSON, P.; SUNDQVIST, B.; ZUBAREV, R. Mass spectrometry of proteins – Uppsala perspectives on past and present. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 268, p. 73-82, 2007.

BERGSTEINDOTTIR, K.; BRENNAN, A.; JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. In the presence of dexamethasone,  $\gamma$  interferon induces rat oligodendrocytes to express major histocompatibility complex class II molecules. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 9054-9058, 1992.

BERLOT, G.; BACER, B.; PIVA, M.; LUCANGELO, U.; VIVIANI, M. Immunoglobulins in Sepsis. **Advances in Sepsis**, v. 6, n. 2, p. 41-46, 2007

BERRY, E. A.; HILLERTON, J. E.; HETT, B.; HARTE, D. Measuring milk quality by milk amyloid. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 28, 2005.

BLANCO, I.; CANTO, H.; FLÓRES, J.; CAMBLOR, C.; CÁRCABA, V.; DE SERRES, F. J.; JANCIAUSKIENE, S.; BUSTILLO, E. F. Long-term augmentation therapy with Alpha-1 Antitrypsin in an MZ-AAT severe persistent asthma. **Monaldi Archives of Chest Disease**, v. 69, n. 4, p. 178-182, 2008.

BOBADILLA, N.A.; TAPIA, E.; JIMÉNEZ, F.; SÁNCHEZ-LOZADA, L. G.; SANTAMARÍA, J.; MONJARDÍN, A.; BOLIO, A.; GAMBÁ, G.; HERRERA-ACOSTA, J. Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. F464-471, 1999.

BOSSCHER, K. D.; BERGHE, W. V.; HAEGEMAN, G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, p. 16-22, 2000.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v. 20, p. 4785-4792, 2000.

BOUWMAN, F. G.; VAN GINNEKEN, M. M. E.; NOBEN, J-P.; ROYACKERS, E.; DE GRAAF-ROELFSEMA, E.; WIJNBERG, I. D.; VAN DER KOLK, J. H.; MARIMAN, E. C. M.; VAN BREDA, E. Differential expression of equine muscle biopsy proteins during normal training and intensified training in young standardbred horses using proteomics technology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part D 5, p. 55-64, 2010.

BOWMAN, B. H.; YANG, F. M.; ADRIAN, G. S. Transferrin: evolution and genetic regulation of expression. **Advances in Genetics**, v. 25, p. 1-38, 1988.

BRESNIHAN, B.; GOGARTY, M.; FITZGERALD, O.; DAYER, J. M.; BURGER, D. Apolipoprotein A-I infiltration in rheumatoid arthritis synovial tissue: a control mechanism of cytokine production? **Arthritis Research Therapy**, v. 6, n. 6, p. 563-566, 2004.

BRIGGS, D. A.; SHARP, D. J.; MILLER, D.; GOSDEN, R. G. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de novo expression by granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 12, p. 1107-1114, 1999.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532-1535, 2004.

BROWN, A. E.; HANSEN, P. J.; ASBURY, A. C. Opsonization of bacteria by uterine secretions of cyclic mares. **American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 119-123, 1985.



BUCCA, S.; CARLI, A.; BUCKLEY, T.; DOLCI, G.; FOGARTY, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, p. 1093-1100, 2008.

BUCURENCI, N.; BLAKE, D. R.; CHIDWICK, K.; WINYARD, P. G.: Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma alpha 1-antitrypsin. **FEBS Letters**, v. 300, p. 21-24, 1992.

CADARIO, M. E.; THATCHER, M. J. D.; LEBLANC, M. M. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Biology of Reproduction**, Series 1, p. 495-500, 1995.

CADARIO, M. E.; MERRITT, A. M.; ARCHBALD, L. F.; THATCHER, W. W.; LEBLANC, M. M. Changes in intrauterine pressure after oxytocin administration in reproductively normal mares and in those with a delay in uterine clearance. **Theriogenology**, v. 51, p. 1017-1025, 1999.

CALAZANS, S. G.; DALECK, C. R.; FAGLIARI, J. J.; REPETTI, C. F.; DE NARDI, A. B.; CASTRO, J. H. T.; FERNANDES, S. C.; CÉSAR, J. R. F.; RODIGHERI, S. M. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1044-1048, 2009.

CAMPBELL, F. M.; WATERSTON, M. M.; ECKERSALL, P. D. Measuring the negative acute phase reactant transthyretin in porcine serum. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 72, 2005.

CARAPETO, M. V.; BARRERA, R.; MAÑE, M. C.; ZARAGOZA, C. Serum  $\alpha$ -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. **Journal of Equine Veterinary Medicine**, v. 26, n. 3, p. 120-127, 2006.

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

CARPINTERO, R.; MADEC, F.; ITURRALDE, M.; ALAVA, M. A.; PIÑEIRO, A.; LAMPREAVE, F. Acute phase proteins in pigs experimentally infected with Aujeszky's disease virus. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 58, 2005a.

CARPINTERO, R.; ALONSO, C.; ITURRALDE, M.; ALAVA, M. A.; PIÑEIRO, A.; LAMPREAVE, F. Acute phase protein response in pigs experimentally infected with African Swine Fever virus. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 25, 2005b.

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

CAUSEY, R. C. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. **Veterinary Journal**, v. 172, p. 405-421, 2006.

CAUSEY, R. C. Mucus and the mare: How little we know. **Theriogenology**, v. 68, p. 386-394, 2007.

CAUSEY, R. C.; PACCAMONTI, D. L.; TODD, W. J. Antiphagocytic properties of uterine isolates of *Streptococcus zooepidemicus* and mechanisms of killing in freshly obtained blood of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 321-328, 1995.

CAUSEY, R. C.; WEBER, J. A.; EMMANS, E. E.; STEPHENSON, L. A.; HOMOLA, A. D.; KNAPP, K. R.; CROWLEY, I. F.; PELLETIER, D. C.; WOOLEY, N. A. The equine immune response to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* during uterine infection. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 248-257, 2006.

CAVAZZANA, I.; NEBULONI, M.; CETIN, I.; ACAIA, B.; SAINO, S.; BORGHI, M. O.; TINCANI, A.; TEDESCO, F.; MERONI, P. L. Complement activation in anti-phospholipid syndrome: A clue for an inflammatory process? **Journal of Autoimmunity**, v. 28, p. 160-164, 2007.

CECILIANI, F.; POCACQUA, V.; PROVASI, E.; BRONZO, V.; MORONI, P.; SALTORELLI, P. Identification of the bovine  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in colostrum and milk. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p.29, 2005.

CELIS, J. E.; GROMOV, P. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 16-21, 1999.

CERÓN, J.; PARRA, M. D. N. Update on acute phase proteins in dogs: advances in measurement assays and clinical Application. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 12, 2005.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 85-99, 2005.

CHANTER, N. Streptococci and enterococci as animal pathogens. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 83, p. 100S–109S, 1997.

CHAPINAL, N.; RUIZ DE LA TORRE, J. L.; BAUCCELLS, M. D.; GASA, J.; MANTECA, X. Haptoglobin and Pig-MAP as indicators of stress in pregnant sows. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 57, 2005.

CHARLES, P.; ELLIOT, M. J.; DAVIS, D.; POTTER, A.; KALDEN, J. R.; ANTONI, C.; BREEDVELD, F. C.; SMOLEN, J. S.; EBERL, G.; DE WOODY, K.; FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- $\alpha$  therapy in rheumatoid arthritis. **The American Association of Immunologists**, v. 163, p. 1521-1528, 1999.

CHARLES-SCHOEMAN, C.; BANQUERIGO, M. L.; HAMA, S.; NAVAB, M.; PARK, G. S.; VAN LENTEN, B. J.; WAGNER, A. C.; FOGELMAN, A. W.; BRAHN, E. Treatment with an polipoprotein A-1 mimetic peptide in combination with pravastatin inhibits collagen-induced arthritis. **Clinical Immunology**, v. 127, p. 234-244, 2008.

CHEN, M.; MOHAMED, R. D.; KALLENBERG, C. G. M. The complement system in systemic autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, p. 276-286, 2010.

CHOE, L. H.; WERNER, B. G.; LEE, K. H. Two-dimensional protein electrophoresis: from molecular pathway discovery to biomarker discovery in neurological disorders. **The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 3, p. 327-335, 2006.

CHURG, A.; DAI, J.; ZAY, K.; KARSAN, A.; HENDRICKS, R.; YEE, C.; MARTIN, R.; MACKENZIE, R.; XIE, C.; ZHANG, L.; SHAPIRO, S.; WRIGHT, J. L. Alpha-1-

Antitrypsin and a broad spectrum metalloprotease inhibitor, RS113456, have similar acute anti-inflammatory effects. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 8, p. 1119-1131, 2001.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885-91, 2002.

COLLINS, H. L.; BANCROFT, G. J. Cytokine enhancement of Complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor for phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 1447-1454, 1992.

CONRADIE, M. M.; DE WET, H.; KOTZE, D. D. R.; BURRIN, J. M.; HOUGH, F. S.; HULLEY, P. A. Vanadate prevents glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblasts *in vitro* and osteocytes *in vivo*. **Journal of Endocrinology**, v. 195, p. 229-240, 2007.

COX, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 4719-4725, 1995.

CRANSHAW, J. H.; GRIFFITHS, M. J. D. Inflammatory processes in the acute respiratory distress syndrome. **Current Anaesthesia and Critical Care**, v. 14, p. 66-73, 2003.

CRISMAN, M. V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K. L. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 24, p. 285-297, 2008.

CRYSTAL, R. G. The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. **Trends in Genetics** v. 5, p. 411-417, 1989.

CUNNINGHAM, K.; SMITH, K. D.; ADDIE, D. D.; ECKERSALL, P. D. The glycosylation pattern of feline alpha 1 acid glycoprotein (AGP). In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 69, 2005.

DABROWSKI, R.; KOSTRO, K.; LISIECKA, U.; SZCZUBIAŁ, M.; KRAKOWSKI, L. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. **Theriogenology**, v. 72, p. 471-476, 2009.

D'ACQUISTO, F.; CICATIELLO, L.; IUVONE, T.; IALENTI, A.; IANARO, A.; ESUMI, H.; WEISZ, A.; CARNUCESTRO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression by glucocorticoid-induced protein(s) in lipopolysaccharide-stimulated J774 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 339, p. 87-95, 1997.

DAFF, S. Calmodulin-dependent regulation of mammalian nitric oxide synthase. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 502-505, 2003.

DE CLERCK, L. S.; MERTENS, A. V.; DE GENDT, C. M.; BRIDTS, C. H.; STEVENS, W. J. Actin polymerisation in neutrophils of rheumatoid arthritis patients in relation to treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Clinica Chimica Acta**, v. 261, p. 19-25, 1997.

DE JONG, G.; VAN DIJK, J. P.; VAN EIJK, H. G. The biology of transferrin. **Clinical Chimica Acta**, v. 190, p. 1-46, 1990.

DELANGE, J.; LANGLOIS, M.; OUYANG J.; CLAEYS, G.; DE BUYZERE, M.; WUYTS, B. Effect of haptoglobin phenotypes on growth of *Streptococcus pyogenes*. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 36, p. 691-696, 1998.

DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MACEDO, L. P.; MELO, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 270-273, 2006.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory Cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DING, Y.; GAO, Z-G.; JACOBSON, K. A.; SUFFREDINI, A. F. Dexamethasone enhances ATP-induced inflammatory responses in endothelial cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 3, p. 693-702, 2010.

ECKERSALL, P. D. The time is right for acute phase protein assays. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 3-5, 2004.

EKERHOVD, E.; BRÄNNSTRÖM, M.; WEIJDEGÅRD, B.; NORSTRÖM, A. Nitric oxide synthases in the human cervix at term pregnancy and effects of nitric oxide on cervical smooth muscle contractility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 83, n. 3, p. 610-616, 2000.

ELLURU, S.; DUONG, J-P.; HUYEN, V.; BAYRY, J.; DELIGNAT, S.; PROST, F.; EPHREMA, A.; SIBERIL, S.; MISRA, N.; LACROIX-DESMZES, S.; KAZATCHKINE, M. D.; KAVERI, S. V. Comparative study of the anti-inflammatory effect of two intravenous immunoglobulin preparations manufactured by different processes. **Immunology Letters**, v. 107, p. 58-62, 2006.

EMILIE, D.; CREVON, M. C.; AUFFREDOU, M. T.; GALANAUD, P. Glucocorticosteroid-dependent synergy between interleukin 1 and interleukin 6 for human B lymphocyte differentiation. **European Journal of Immunology**, v. 18, p. 2043-2047, 1988.

ESCHER, G.; GALLI, I.; VISHWANATH, B. S.; FREY, B. M.; FREY, F. J. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  enhance the cortisone/cortisol shuttle. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, p. 189-198, 1997.

EVANS, M. J.; HAMER, J. M.; GASON, L. M.; GRAHAM, L. S.; ASBURY, A. C.; IRVINE, C. H. G. Clearance of bacteria and non antigenic markers following intrauterine inoculation into maiden mares; effect of steroid hormone environment. **Theriogenology**, v. 26, p. 37-50, 1986.

EVANS, M. J.; HAMER, J. M.; GASON, L. M.; IRVINE, C. H. G. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 35, p. 327-334, 1987.

FAGLIARI, J. J.; MCCLENAHAN, D.; EVANSON, O. A.; WEISS, D. J. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 1234-1237, 1998.

FANG, L.; ZHANG, Y.; LEHMANN, J.; WANG, Y.; JI, H.; DING, D. Design and synthesis of furoxan-based nitric oxide-releasing glucocorticoid derivatives with potent anti-inflammatory activity and improved safety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 1062-1066, 2007.

FEENEY, R. E.; KOMATSU, St. K. The transferrins. **Structure and Bonding**, v. 1, p. 149-206, 1966.

FERNÁNDEZ-RUIZ, E. F.; REBOLLO, A.; NIETO, M. A.; SANZ, E.; SOMOZA, C.; RAMIREZ, F.; LOPES-RIVAS, A.; SILVA, A. IL-2 protects T cell hybrids from the cytolytic effect of glucocorticoids. Synergistic effect of IL-2 and dexamethasone in the

induction of high-affinity IL-2 receptors. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 4146-4151, 1989.

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

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v. 67, p. 556-562, 2007.

FINEHOUT, E. J.; LEE, K. H. An introduction to mass spectrometry Applications in biological research. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 32, p. 93-100, 2004.

FIORATTI, E. G.; VILLAVERDE, A. I. S. B.; AVANZI, B. R.; LEAL, A. C. M. S.; CALDAS-BUSSIARI, M. C.; ALAVARENGA, M. A. Nitric oxide concentration in free uterine fluid after dexamethasone treatment of mares resistant and susceptible to endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. S121, p. S113-S114, 2010.

FISCHETTI, V. A. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n.3 p. 285-314, 1989.

FORESTA, C.; MANONI, F.; BUSINARO, V.; DONADEL, C.; INDINO, M.; SCANDELLARI, C. Possible significance of transferrin levels in seminal plasma of fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 7, p. 77-82, 1986.

FOURNIER, T.; MEDJOUBI, N. N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein: review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, p. 157-171, 2000.

FRANCHIMONT, D.; MARTENS, H.; HAGELSTEIN, M. T.; LOUIS, E.; DEWE, W.; CHROUSOS, G. P.; BELAICHE, J.; GEENEN, V. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 2834-2839, 1999.

FREAN, S. P.; BRYANT, C. E.; FRÖLING, I-L.; ELLIOTT, J.; LEES, P. Nitric oxide production by equine articular cells *in vitro*. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, n. 2, p. 98-102, 1997.

FÜERLL, M.; KIRBACH, H.; PIETSCH, H. Haptoglobin in routine analysis of bovine serum. **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 11, 2005.

FUMUSO, E.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.; BOWDEN, R. A. Endometrial IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 31-41, 2003.

FUMUSO, E.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; DAVID, O.; WADE, J.; ROGAN, D. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 282-285, 2006.

FUMUSO, E. A.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 30-39, 2007.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 448-454, 1999.

GABAY, C.; SINGWE, M.; GENIN, B.; MEYER, O.; MENTHA, G.; LE COULTRE, C.; VISCHER, T.; GUERNE, P. A. Circulating levels of IL-11 and leukaemia inhibitory factor (LIF) do not significantly participate in the production of acute phase proteins by the liver. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 105, p. 260-265, 1996.

GALKIN, A. A.; TUMANOV, E. A.; TIMIN, E. N.; KARELIN, A. A. Effect of activators on neutrophil mobility. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 124, n. 10, p. 409-412, 1997.



GALON, J.; FRANCHIMONT, D.; HIROI, N.; FREY, G.; BOETTNER, A.; EHRHART-BORNSTEIN, M.; O'SHEA, J. J.; CHROUSOS, G. P.; BORNSTEIN, A. R. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 1, p. 61-71, 2002.

GETTINS, P. G. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemistry Review**, 102, p. 4751-4803, 2002.

GHASEMZADEH-NAVA, H.; GHASEMI, F.; TAJIK, P.; SHIRAZI, A. A review of mare endometritis in Iran. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 5, p. 188-192, 2004.

GODSON, D.L.; CAMPOS, M.; ATTAH-POKU, S.K.; REDMOND, M.J.; CORDEIRO, D.M.; SETHI, M.S.; HARLAND, R.J.; BABIUK, L.A. Serum haptoglobin as an indicator of acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, p.277-292, 1996.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GROSSERT, J. S. A retrospective view of mass spectrometry and natural products – sixty years of progress, with a focus on contributions by R. Graham Cooks. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 212, p. 65-79, 2001.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; UPRAGARIN, N.; VAN EDEREN, A. M.; ADEWUYI, S.; CANDIANI, D.; NGUYEN, T. K. A.; SABECKIENE, J. Acute phase reactants, challenge in the near future. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 19-22, 2005a.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, v. 6B, n. 11, p. 1045-1056, 2005b.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLDB, T. A.; KOOPMANS, S. J.; VAN DIJKC, E.; MELOEND, R. H. Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**, v. 108, p. 229-232, 2006.

GUIDA, L.; O'HEHIR, R. E.; HAWRYLOWICZ, C. M. Peripheral blood eosinophils of major histocompatibility complex class II expression by human synergy between dexamethasone and interleukin-5 for the induction. **Blood**, v. 84, p. 2733-2740, 1994.

GUTJAHR, S.; PACCAMONTI, D. L.; PYCOCK, J. F.; TAVERNE, M. A.; DIELEMAN, S. J.; VAN DER WEIJDEN, G. C. Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mares. **Theriogenology**, v. 54, p. 447-456, 2000.

HADZIC, R.; NITA, I.; TASSIDIS, H.; RIESBECK, K.; WINGREN, A. J.; JANCIAUSKIENE, S.  $\alpha$ 1-Antitrypsin inhibits *Moraxella catarrhalis* MID protein-induced tonsillar B cell proliferation and IL-6 release. **Immunology Letters**, v. 102, p. 141-147, 2006.

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

HEEGAARD, P. M. H.; KLAUSEN, J.; NIELSEN, J. P.; GONZÁLEZ-RAMÓN, N.; PIÑEIRO, M.; LAMPREAVE, F.; ALAVA, M. A. The porcine acute phase response to infection with *actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119b, n. 2, p. 365-373, 1998.

HEEGAARD, P. M. H.; STOCKMARR, A.; SØRENSEN, N. S. Porcine acute phase proteins in experimental models of infectious diseases. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 5, 2005.

HERMOSO, M. A.; MATSUGUCHI, T.; SMOAK, K.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids and Tumor Necrosis Factor Alpha cooperatively regulate Toll-Like Receptor 2 gene expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, p. 4743-4756, 2004.

HODGSON, J. C. Acute phase response profiles as indicators of disease severity, recovery or vaccine efficacy in bovids infected with *Pasteurella multocida*. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p.15-17, 2005.

HOUSIE, M.; ADAMSON, M.; PENNY, C. Actin binding protein expression is altered in uterine luminal epithelium by clomiphene citrate, a synthetic estrogen receptor modulator. **Theriogenology**, v. 69, p. 700-713, 2008.

HU, M. C.; WALLS, M. A.; STROOP, S. D.; REDDISH, M. A.; BEALL, B.; DALE, J. B. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 2171-2177, 2002.

HUGHES, J. P.; LOY, R. G. Investigations on the effect of intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. In: **Proceedings of the 15th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, p. 285-289, 1969.

HULTÉN, C.; TULAMO, R. M.; SUOMINEN, M. M.; BURVALL, K.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) a clinically useful inflammatory marker in the horse. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p. 267-81, 1999.

HULTÉN, C.; GRÖNLUND, U.; HIRVONEN, J.; TULAMO, R.-M.; SUOMINEN, M. M.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and  $\alpha$ 2-globulins during induced non-infectious arthritis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 699-704, 2002.

HUMBLET, M.; GUYOT, H.; BOUDRY, B.; MBAYAHI, F.; HANZEN, C.; ROLLIN, F.; GODEAU, J. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A and clinical status in the survey of dairy herds during a six months housing period. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 9-10, 2005.

HURTGEN, J. P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. **Theriogenology**, v. 66, p. 560-566, 2006.

HYKA, N.; DAYER, J. M.; MODOUX, C.; KOHNO, T.; EDWARDS III, C. K.; ROUX-LOMBARD, P.; BURGER, D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2381-2389, 2001.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

JACQUOT, J.; GOLDSTEIN, G.; SOMMERHOFF, C.; BENALI, R.; PUCHELLE, E.; BASBAUM, C. B. Synthesis and secretion of an albumin-like protein by cultured bovine tracheal gland serous cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 155, p. 857-862, 1988.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE. IN: JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 4 ed. London: Current Biology Publications, p. 307-361, 1999.

JEFFCOTT, L. B.; ROSSDALE, P. D.; FREESTONE, J.; FRANK, C. J.; TOWERS-CLARK, P. F. An assessment of wastage in Thoroughbred racing from conception to 4 years of age. **Equine Veterinary Journal**, v. 14, p. 185-198, 1982.

JIE, Z.; CAI, Y.; YANG, W.; JIN, M.; ZHU, W.; ZHU, C. Protective effects of  $\alpha_1$ -antitrypsin on acute lung injury in rabbits induced by endotoxin. **Chinese Medical Journal**, v. 116, p. 1678-1682, 2003.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v. 61, p. 255-266, 2004.

KANEKO, J. J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneko, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. London: Academic Press, p. 117-138, 1997.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen. **Biology Reproduction Monograph**, n. 1, p. 515-518, 1995.

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

KATILA, T. Neutrophils in uterine fluid after insemination with fresh live spermatozoa or with killed spermatozoa. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 540, 1997.

KATILA, T. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 31-38, 2005.

KATILA, T.; LOCK, T.; SMITH, W. E. Lysozyme, alkaline phosphatase and neutrophils in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. **Theriogenology**, v. 33, p. 723-732, 1990.

KENT, J. E.; GOODALL, J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, p. 59-66, 1991.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

KIM, Y-C. L.; WOLF, G. Vitamin A deficiency and the glycoproteins of rat corneal epithelium. **The Journal of Nutrition**, v. 104, p. 710-718, 1974.

KIM, J. Y.; LEE, Y. G.; KIM, M-Y.; BYEON, S. U.; RHEE, M. H.; PARK, J.; KATZ, D. R.; CHAIN, B. M.; CHO, J. Y. Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 431-443, 2010.

KINKADE JR., J. M.; MILLER III, W. W. K.; SEGARS, F. M. Isolation and characterization of murine lactoferrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 446, n. 2, p. 407-418, 1976.

KLOSE J: Protein mAPPing by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel APProach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KNAPPTEIN, S.; IDE, T.; SCHMIDT, M. A.; HEUSIPP, G.  $\alpha_1$ -antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic Escherichia coli strains. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 4344-4350, 2004.

KNUDSEN, O. Partial dilatation of the uterus as a cause of sterility in the mare. **Cornell Veterinary**, v. 54, p. 423-438, 1964.

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

KOLM, G.; KLEIN, D.; KNAPP, E.; WATANABE, K.; WALTER, I. Lactoferrin expression in the horse endometrium: Relevance in persisting mating-induced endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 159-167, 2006.

KRYCH, M.; ATKINSON, J. P.; HOLERS, V. M. Complement receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 4, p. 8-13, 1992.

KWON, O.; MOLITORIS, B. A.; PESCOVITZ, M.; KELLY, K. J. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemic injury in renal allografts. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 41, n. 5, p. 1074-1087, 2003.

LASSITER, M. O.; NEWSOME, A. L.; SAMS, L. D.; ARNOLD, R. R. Characterization of lactoferrin interaction with *Streptococcus mutans*. **Journal of Dental Research**, v. 66, n.2, p. 480-485, 1987.

LAURELL, C. B.; ERIKSSON, S. The electrophoretic  $\alpha$ 1-globulin pattern of serum in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 15, p. 132-142, 1963.

LEBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: Ball, B. A. **Recent Advances in Equine Reproduction**, 2003a.

LEBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis. In: Robinson, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine 5**. Philadelphia:Saunders, p. 234-237, 2003b.

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

LEBLANC, M. M.; JOHNSON, R. D.; CALDERWOOD MAYS, M. B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Biology of Reproduction Monograph**, n. 1, p. 501-506, 1995.

LEBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; JONES, L.; CAGE, C.; MAURAGIS, D. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. **Theriogenology**, v. 50, p. 49-54, 1998.

LEBLANC, M. M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A. J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 68, p. 403-412, 2007.

LECOQ, L.; VINCENT, P.; LAVOIE-LAMOUREUX, A.; LAVOIE, J-P. Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 126-131, 2009.

LEE, W. L.; GRINSTEIN, S. The tangled webs that neutrophils wave. **Science**, v. 303, p. 1477-1478, 2004.

LEWIS, E. C.; SHAPIRO, L.; BOWERS, O. J.; DINARELLO, C. A.  $\alpha_1$ -Antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102 n. 34 p. 12153-12158, 2005.

LEWIS, E. C.; MIZRAHI, M.; TOLEDANO, M.; DEFELICE, N.; WRIGHT, J. L.; CHURG, A.; SHAPIRO, L.; DINARELLO, C. A.  $\alpha_1$ -Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105 n. 42, p. 16236-16241, 2008.

LIBERMAN, A. C.; REFOJO, D.; DRUKER, J.; TOSCANO, M.; REIN, T.; HOLSBOER, F.; ARZT, E. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, p. 1177-1188, 2007.

LIBERMAN, A. C.; DRUKER, J.; REFOJO, D.; HOLSBOER, F.; ARZT, E. Glucocorticoids inhibit GATA-3 phosphorylation and activity in T cells. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, p. 1558-1571, 2009.

LIBERT, C.; VAN MOLLE, W.; BROUCKAERT, P.; FIERS, W. Alpha 1-antitrypsin inhibits the lethal response to TNF in mice. **The Journal of Immunology**, v. 157, p. 5126-5129, 1996.

LINKE, R. P.; BOCK, V.; VALET, G.; ROTHE, G. Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176, p. 1100-1105, 1991.

LINTHORST, A. C. E.; FLACHSKAMM, C.; HOPKINS, S. J.; HOADLEY, M. E.; LABEUR, M. S.; HOLSBOER, F.; REUL, J. M. H. M. Lon-term intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing hormone alters neuroendocrine, neurochemical, autonomic, behavioral, and cytokine responses to a systemic inflammatory challenge. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 11, p. 4448-4460, 1997.

LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. **Theriogenology**, v. 70, p. 415-420, 2008.

LIU, I. K. M.; CHEUNG, A. T. W.; WALSH, E. M.; AYIN, S. The functional competence of uterine-derived polymorpho-nuclear neutrophils (PMN) from mares resistant and susceptible to chronic uterine infection: A sequential migration analysis. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 1168-1174, 1986.

LLAMAS, M. S.; BOYLE, L.; LYNCH, B.; ARKINS, S. Effects of two teeth resection methods on plasma c-reactive protein and cortisol in pigs. In: **International Colloquium on Animal Acute Phase Proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 26-27, 2005.

LOSINNO, L.; WOODS, G. L.; MIRAGAYA, M. H. Uterine and oviductal inflammation in anovulatory mares ultrasonographically-detected intrauterine luminal fluid. **Theriogenology**, v. 48, p. 1361-1368, 1997.

LOWRIE, M.; PENDERIS, J.; ECKERSALL, P. D.; MCLAUGHLIN, M.; MELLOR, D.; ANDERSON, T. J. The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 125-130, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, J. W.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYOUMI, S.; TAMION, F.; PETIT, J.; DÉCHELOTTE, P.; DAUGUET, C.; SCOTTE, M.; HIRON, M.; LEPLINGARD, A.; SALIER, J. P.; DAVEAU, M.; LEBRETON, J. P. Induction and Modulation of Acute-Phase Response by Protein Malnutrition in Rats: Comparative Effect of Systemic and Localized Inflammation on Interleukin-6 and Acute-Phase Protein Synthesis. **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 166-174, 1998.



MACKAY, R. J. Inflammation in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 16, n. 1, p. 15-27, 2000.

MAISCHBERGER, E.; IRWIN, J. A.; CARRINGTON, S. D.; DUGGAN, V. E. Equine post-breeding endometritis: A review. **Irish Veterinary Journal**, v. 61, n. 3, p. 163-168, 2008.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MATTOS, A. L. G.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Intrauterine fluid accumulation during foal heat increases embryonic death. **Pferdeheilkunde**, v. 19, p. 246-249, 2003a.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MATTOS, A. L. G.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Pregnancy and embryo loss rates in non-lactating mares bred in the first or in other estrus cycles during the breeding season. **Pferdeheilkunde**, v. 19, n. 6, p. 641-645, 2003b.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S.M.; JOBIM, M.I.M.; ESMERALDINO, A.M.T.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Avaliação do perfil protéico da secreção endometrial pura da égua através da eletroforese bi-dimensional: Efeito do ciclo. In: MALSCHITZKY, E. Artigo 1. Avaliação do perfil protéico da secreção endometrial da égua. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias), UFRGS, 2007a.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S.M.; ESMERALDINO, A.M.T.; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. In: MALSCHITZKY, E. Artigo 3. Perfil protéico da secreção uterina de éguas no primeiro e em diestro subsequentes da temporada reprodutiva. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias), UFRGS, 2007b.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S.; ESMERALDINO, A. T.; NEVES, A. P.; GARBADE, P.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 74-78, 2008.

MALYSHEV, I. Y.; SHNYRA, A. Controlled modulation of inflammatory, stress and apoptotic responses in macrophages. **Current Drug Targets – Immune, Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 3, p. 1-22, 2003.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; GINEL, P. J.; CERÓN, J. J. Effect of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. **Veterinary Record**, v. 154, p. 814-817, 2004.

MATTOS, R. C.; MALSCHITZKY, E.; GREGORY, R. M. Effect of different postbreeding treatments on fertility of Thoroughbred mares. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.512-515, 1997a.

MATTOS, R.; CASTILHO, L. F. F.; MALSCHITZKY, E.; NEVES, A. P.; KELLER, A.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 521-524, 1997b.

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

MCCORD, J. M.; DAY, E. D. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. **FEBS Letters**, v. 86, n. 1, p. 139-142, 1978.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Advances in immunology: innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 337-344, 2000.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.

METTE, C.; DOOLEWEERDTA, B. C.; STINEB, J.; MIKI, B. A.; ROENNA, P.M.; HENRIKA, L-J. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, p. 95-105, 2010.

MILETIC, V. D.; FRANK, M. M. Complement-immunoglobulin interactions. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 41-47, 1995.

MIKLOS, G. L.; MALESZKA, R. Protein functions and biological contexts. **Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 169-178, 2001.

MILLER, I.; FOUNTOULAKIS, M.; DUVIGNEAU, C.; M HARTL R.; DOBRETSBERGER, M.; SIEBER, K.; PROSL, H.; Gemeiner, M. The plasma proteome of equus caballus: patterns under baseline conditions and during anthelmintic treatment. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 48, 2005.

MILLS, P. C.; AUER, D. E.; KRAMER, H.; BARRY, D.; NG, J. C. Effects of inflammation-associated acute-phase response on hepatic and renal indices in the horse. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 3, p. 187-194, 1998.

MISCHKE, R.; ECKERSALL, P. D. Changes in c-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p.35, 2005.

MONDER, C. The forms and functions of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, p. 161-165, 1993.

MOORE, B. O.; BRYANS, J. T. Antigenic classification of group C animal streptococci. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 155, p. 416-421, 1969.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KOC, H.; KILLIAN, G. J. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 169-188, 2007.

MÜLLER, S.; MARTIN, S.; KOENIG, W.; HANIFI-MOGHADDAM, P.; RATHMANN, W.; HAASTERT, B.; GIANI, G.; ILLIG, T.; THORAND, B.; KOLB, H. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF- $\alpha$  or its receptors. **Diabetologia**, v. 45, p. 805-812, 2002.

MURATA, H.; MIYAMOTO, T. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. **The British Veterinary Journal**, v. 149, p. 277-283, 1993.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 28-40, 2004.

NASH, D. M.; SHELDON, I. M.; HERATH, S.; LANE, E. A. Markers of the uterine innate immune response of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 31-39, 2010.

NAVAB, M.; HAMA, S. Y.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; HASSAN, K.; HOUGH, G. P.; WATSON, A. D.; REDDY, S. T.; SEVANIAN, A.; FONAROW, G. C.; FOGELMAN, A. M. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. **Journal Lipid Research**, v. 41, n. 9, p. 1495-1508, 2000.

NAVAB, M.; BERLINER, J. A.; SUBBANAGOUNDER, G.; HAMA, S.; LUSIS, A. J.; CASTELLANI, L. W.; REDDY, S.; SHIH, D.; SHI, W.; WATSON, A. D.; LENTEN, B. J. V.; VORA, D.; FOGELMAN, A. M. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 21, n. 4, p. 481-488, 2001.

NEILANDS, J. B. Evolution of biological iron binding centers. **Structure and Bonding**, v. 11, p. 145-170, 1972.

NEVES, A. P.; KELLER, A.; ZERBE, H.; LEIBOLD, W.; KLUG, E.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. *In vitro* evaluation of chemotaxis, vitality, and generation of reactive oxygen species of fresh or frozen equine leukocytes used in the treatment of endometritis. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 199-206, 2005.

NEWCOMBE, J. R. The effect of the incidence and depth of intra-uterine fluid in early dioestrus on pregnancy rate in mares. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 545, 1997.

NICOLAIDES, N. C.; GALATA, Z.; KINO, T.; CHROUSOS, G. P. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. **Steroids**, v. 75, p. 1-12, 2010.

NIELSEN, J.M. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, p. 510-518, 2005.

NIELSEN, L.; RØNTVED, C. M.; PEDERSEN, L. H.; INGVARTSEN, K. L. Quantitative cytokine and acute phase protein mRNA expression in liver and mammary gland from dairy cows experimentally infected with *Streptococcus uberis*. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p.46-47, 2005.

NIELSEN, J. M.; TROEDSSON, M. H.; PEDERSEN, M. R.; BOJESSEN, A. M.; LEHN-JENSEN, H.; ZENT, W. W. Diagnosis endometritis in the mare based on bacteriological

and cytological examinations of the endometrium: comparison of results obtained by swabs and biopsies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 1, 2010.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E. D. Does artificial insemination with chilled, extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service? **Theriogenology**, v. 47, p. 583-590, 1997.

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

NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H.; WATSON, E. D. Oxytocin and PGF<sub>2α</sub> release in mares resistant and susceptible to persistent mating-induced endometritis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 2000.

NISHIO, Y.; ISSHIKI, H.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. **Molecular and Cell Biology**, v. 13, p. 1854-1862, 1993.

NITA, I.; HOLLANDER, C.; WESTIN, U.; JANCIAUSKIENE, S. M. Prolastin, a pharmaceutical preparation of purified human α1-antitrypsin, blocks endotoxin-mediated cytokine release. **Respiratory Research**, v. 6, p. 12-23, 2005.

NOOIJ, F. J. M.; VAN DER SLUIJS-GELLING, A. J.; JOL-VAN DER ZIJDE, C. M.; VAN TOL, M. J. D.; HAAS, H.; RADL, J. Immunoblotting techniques for the detection of low level homogeneous immunoglobulin components in serum. **Journal of Immunological Methods**, v. 134, p. 273-281, 1990.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

O'FARRELL, P. Z.; GOODMAN, H. M.; O'FARRELL, P. H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, v. 12, p. 1133-1142, 1977.

OUKACHA, F.; BERTRAND, P.; BUSTIN, J.; HUMBLET, M.; AMORY, H.; GODEAU, J. Relationship between haptoglobin, fibrinogen and clinical status in horses. In:

**International colloquium on animal acute phase proteins.** Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 62, 2005.

PACE, T. W. W.; HU, F.; MILLER, A. H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, p.9-19, 2007.

PALLARÉS, F. J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; SEVA, J.; RAMIS, G.; FUENTES, P.; BERNABÉ, A.; MUÑOZ, A.; CERÓN, J. J. Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 369–373, 2008.

PALM, F; WALTER, I.; BUDIK, S.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; AURICH, C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1b, IL-6, TNF-a and COX-2 mRNA in the equine endometrium. **Theriogenology**, v. 70, p. 843-851, 2008.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived. **Nature**, v. 327, n. 11, p. 324-326, 1987.

PALTRINIERI, S. APP in feline diseases: quantitative changes and alteration in glycosylation. In: **International colloquium on animal acute phase proteins.** Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 13, 2005.

PAPA, F. O.; DELL'AQUA Jr., J. A.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; ZAHN, F. S.; LOPES, M. D. Use of corticosteroid therapy on the modulation of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen semen. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 79-82, 2008.

PARRA, M. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; CERÓN, J. J. Effects of haemolysis, lipaemia and bilirubinaemia in a TR-IFMA for canine CRP. In: **International colloquium on animal acute phase proteins.** Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 75-76, 2005.

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

PEREIRA, H. M. G.; MARQUES, M. A. S.; CARDOSO, J. N.; AQUINO NETO, F. R. Análise de glicocorticosteróides por CG-EM: uma nova abordagem de derivatização para o controle de dopagem no esporte. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1096-1102, 2002

PEREZ, S. A.; MAHAIRA, L. G.; DEMIRTZOGLU, F. J.; SOTIROPOULOU, P. A.; IOANNIDIS, P.; ILIOPOULOU, E. G.; GRITZAPIS, A. D.; SOTIRIADOU, N. N.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M. Apotential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival. **Blood**, v. 106, n. 1, p. 158-166, 2005.

PETERS, T. Serum Albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 37, p. 161-245, 1985.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research** v. 35, p. 163-187, 2004.

PETERSEN, H. H.; GARDNER, I. A.; ROSSITTO, P.; LARSEN, H. D.; HEEGAARD, P. M. H. Accuracy of milk amyloid A (MAA) concentration and somatic cell count for diagnosing bovine mastitis. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 43-44, 2005.

PETERSON, F. B.; MCFEELY, R. A.; DAVID, J. S. E. Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare. In: **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v. 15, p. 279-282, 1969.

POLLOCK, P. J.; PRENDERGAST, M.; BELLENGER, C. R. The acute phase response to surgery in clinically normal and diseased horses. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 87, 2005.

POTEMPA, J.; WUNDERLICH, J. K.; TRAVIS, J. Comparative properties of three functionally different but structurally related serpin variants from horse plasma. **Biochemistry Journal**, v. 274, p. 465-471, 1991.

PUDRITH, C.; MARTIN, D.; KIM, Y. H.; JAHNG, P.; KIM, B.; WALL, M.; JUNG, T. Glucocorticoids reduce nitric oxide concentration in middle ear effusion from lipopolysaccharide induced otitis media. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 74, p. 384-386, 2010.

PYCOCK, J. F. How to maximize the chances of breeding successfully from the older maiden mare. In: **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v. 52, p. 245-249, 2006.

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

QURESHI, N.; VOGEL, S. N.; VANWAY 3RD, C.; PAPASIAN, C. J.; QURESHI, A. A.; MORRISON, D. C. The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function. **Immunologic Research**, v. 31, p. 243-260, 2005.

RAMBAGS, B. P. B. Early pregnancy loss in aged mares: probable causes and cures. **Pferdeheilkunde**, v. 19, p. 653-656, 2003.

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

RASMUSSEN, S.; LARSENA, A. S.; THOMSENA, S. T.; KEHLET, H. Intra-articular glucocorticoid, bupivacaine and morphine reduces pain, inflammatory response and convalescence after arthroscopic meniscectomy. **Pain**, v. 78, p. 131-134, 1998.

RATH, N. C. Ovotransferrin as an avian acute phase protein and its immunomodulatory function. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 18, 2005.

REGASSA, F.; NOAKES, D. E. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFMin relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. **Veterinary Record**, v. 144, p. 502-506, 1999.

REILAS, T. Uterine luminal environment of the mare. **Academic dissertation**, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 391p, 2001.

REILAS, T.; KATILA, T.; MAKELA, O.; HUHTINEN, M.; KOSKINEN, E. Intrauterine fluid accumulation in oestrous mares. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 38, p. 69-78, 1997.



RIGBY, S. L.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R. C.; COLLERAN, P.; THOMPSON, J. A.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; BRINSKO, S. P.; TAYLOR, T.; WILKERSON, M. K.; DELP, M. D. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 740-747, 2001.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: \_\_\_\_\_ **Pathologic Basis of Disease**, 6<sup>a</sup> ed, p. 32-58, 1999.

RODEBERG, D. A.; CHAET, M. S.; BASS, R. C.; ARKOVITZ, M. S.; GARCIA, V. F. Nitric oxide: An overview. **The American Journal of Surgery**, v. 170, p. 292-303, 1995.

RODNIGHT, R.; ZAMANI, R.; TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 24, p. 27-38, 1988.

ROGAN, D.; FUMUSO, E.; RODRÍGUEZ, E.; WADE, J.; SÁNCHEZ BRUNI, S. F. Use of a mycobacterial cell wall extract (MCWE) in susceptible mares to clear experimentally induced endometritis with *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 3, p. 112-117, 2007.

ROGERS, K. R. The cytoskeleton and its importance as a mediator of inflammation. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 51, p. 565-571, 1992.

SANTOS JÚNIOR, J. C. M. Rubor, calor, tumor, dor e o paciente grave. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 23, n. 3, p. 206, 210, 2003.

SAXENA, D.; PUROHIT, S. B.; KUMAR, P. G.; LALORAYA, M. Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at implantation. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 384-391, 2000.

SCUDAMORE, C. L.; PEMBERTON, A. D.; MILLER, H. R. P.; McDONNELL, A. M.; THOMSON, S. R. M. Measurement by ELISA of equine alpha-1-proteinase inhibitor in uterine flushings from mares. **Research in Veterinary Science**, v. 57, p. 45-52, 1994.

SELLAR, G. C.; WHITEHEAD, A. S. The acute phase response and major acute phase proteins in early host defense. **Journal of Biomedical Science**, v. 4, p. 1-9, 1993.

SENIOR, R. M.; GRIFFIN, G. L.; MECHAM, R. P. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 66, p. 859-862, 1980.

SENIOR, R. M.; HINEK, A.; GRIFFIN, G. L.; PIPOLY, D. J.; COURCH, E. C.; MECHAM, R. P. Neutrophils show chemotaxis to type IV collagen and its 7S domain and contain a 67 kD type IV collagen binding protein with lectin properties. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 1, p. 479-487, 1989.

SHAMAY, A.; FEUERMAN, Y.; HOMANS, R.; MABGEESH, S. J. Albumin a mammary gland secreting cell keeper. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 77-78, 2005.

SHANZER, A.; LIBMAN, J.; LIFSON, S. Multiple weak forces in ion-binding molecules. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 10, p. 1421-1435, 1992.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A.; DOBSON, H. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. **Veterinary Record**, v. 148, p. 172-175, 2001.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver- stained polyacrilamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SHIEH, J. H.; PETERSON, R. H.; MOORE, M. A. Cytokines and dexamethasone modulation of IL-1 receptors on human neutrophils *in vitro*. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 3515-3524, 1993.

SHINODA, J.; MCLAUGHLIN, K. E.; BELL, H. S.; SWAROOP, G. R.; YAMAGUCHI, S-I.; HOLMES, M. C.; WHITTLE, A. R. Molecular mechanisms underlying dexamethasone inhibition of iNOS expression and activity in C6 glioma cells. **GLIA**, v. 42, p. 68-76, 2003.

SLOCOMBE, L. L.; COLDITZ, I. G. Evaluating the stress of production in cattle using haptoglobin. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 30, 2005.

SMITH, K. The glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein – structurally complex, functionally important? In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 8, 2005.

SILVERMAN, M. N.; MILLER, A. H.; BIRON, C. A.; PEARCE, B. D. Characterization of an Interleukin-6- and adrenocorticotropin-dependent, immune-to-adrenal pathway during viral infection. **Endocrinology**, v. 145, n. 8, p. 3580-3589, 2004.

SORDILLO, L. M.; NICKERSON, S. C.; AKERS, R. M.; OLIVER, S. P. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. **International Journal of Biochemistry**, v. 19, p. 1165-1172, 1987.

SØRENSEN, N. S.; TEGTMEIER, C.; ANDRESEN, L. O.; PIÑEIRO, M.; TOUSSAINT, M. J. M.; CAMPBELL, F. M.; HEEGAARD, P. M. H. The porcine acute phase protein response to experimental *Streptococcus suis* infection. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p.33, 2005.

STAKAUSKAS, R.; LEIBOLD, W.; PIESKUS, J.; SCHUBERTH, H. The effect of  $\alpha$ -1-acid glycoprotein on ROS production *in vitro* is limited by stimulus nature and simultaneous presence. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 50, 2005.

STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 217-230, 1999.

SUFFREDINI, A. F.; FANTUZZI, G.; BADOLATO, R.; OPPENHEIM, J. J.; O'GRADY, N. New insights into the biology of the acute phase response. **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, p. 203–214, 1999.

TAIRA, T.; FUJINAGA, T.; OKUMURA, M.; YAMASHITA, K.; TSUNODA, N.; MIZUNO, S. Equine haptoglobin: isolation, characterization and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, p. 435-442, 1992a.

TAIRA, T.; FUJINAGA, T.; TAMURA, K.; IZUMI, M.; ITOH, H.; TSUNODA, N.; YAMASHITA, K.; OKUMURA, M.; MIZUNO, S. Isolation and characterization of alpha 1-acid glycoprotein from horses, and its evaluation as an acute-phase reactive protein in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 961-965, 1992b.

THOMAS, T.; SCHREIBER, G. The expression of genes encoding for positive acute-phase proteins in the reproductive tract of the female rat. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 243, n. 2, p. 381-384, 1989.

TILG, H.; VANNIER, E.; VACHINO, G.; DINARELLO, C. A.; MIER, J. W. Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 5, p. 1629-36, 1993.

TIMONEY, J. F.; WALKER, J.; ZHOU, M.; DING, J. Cloning and sequence analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 4, p. 1440-1445, 1995.

TOMLINSON, S. Complement defense mechanisms. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, p. 83-89, 1993.

TOUSSAINT, M. J. M.; CAMPBELL, F. M.; PIÑEIRO, M.; GRUYS, E. Measuring negative acute phase proteins to assess acute phase response and starvation. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 14, 2005.

TRAVIS, J.; SALVESEN, G. Human plasma proteinase inhibitors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 655-709, 1983.

TROEDSSON, M. H. T. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 516-520, 1997.

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

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-induced endometritis in mares. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 22, p. 705-712, 2006.

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

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

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

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K.; ING, M.; PASCOE, J.; THURMOND, M. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 307-313, 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. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 502-506, 1993c.

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

TROEDSSON, M. H. T.; STEIGER, B. N.; IBRAHIM, M. N.; FOSTER, D. N.; CRABO, B. G. Mechanism of sperm induced endometritis in the mare. **Biology of Reproduction**, Supplement 52, p. 307-307, 1995.

TROEDSSON, M. H. T.; ALGHAMDI, A.; LASCHKEWITSCH, T.; XUE, J-L. Sperm motility is altered in uterine secretions from mares with postbreeding endometritis. In: **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 44, p. 66-67, 1998.

TROEDSSON, M. H. T.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A. M.; DAHMS, B.; CRABO, B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 273-278, 2001.

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

TU, G. F.; ACHEN, M. G.; ALDRED, A. R.; SOUTHWELL, B. R.; SCHREIBER, G. The distribution of cerebral expression of the transferrin gene is species specific. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 6201-6208, 1991.

TUNÓN, A-M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; HULTÉN, C.; NUMMIJILRVI, A.; MAGNUSSON, U. Concentrations of total protein, albumin and immunoglobulins in undiluted uterine fluid of gynecologically healthy mares. **Theriogenology**, v. 50, p. 821-831, 1998.

VAN TROYS, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; AMPE, C. Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1448, p. 323-348, 1999.

VANDAELE, H.; DAELS, P.; PIEPERS, S.; LEBLANC, M. Effect of post-insemination dexamethasone treatment on pregnancy rates in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 121S, p. S110-S112, 2010.

VARRICCHIO, F.; STROMBERG, K. An albumin-like protein is the major secretory protein of ovarian epithelial cells in vivo and in vitro. **Journal of Gynecological Cancer**, v. 4, p. 328-332. 1994.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, J.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; MIKLOS, G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.; ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R-R.; KE, Z.; KETCHUM, K.A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z. Y.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M-H.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S. C.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, K.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M. L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C. HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH,

F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCHE, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y-H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N .N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGO, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y-H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A. D.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A. ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, p. 1304-1351, 2001.

VERONESI, M. C.; CARLUCESTRO, A.; KINDAHL, H.; FAUSTINI, M.; BATTOCCHIO, M.; CAIROLI, F. Oxytocin-induced PGF<sub>2</sub> alpha release in mares with and without post-breeding delayed uterine clearance. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 259-262, 2006.

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

WAGATSUMA, A.; FUJIMOTO, K.; YAMADA, S. Alteration in albumin level during modified muscular activity. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 12, p. 143-149, 2002.

WALKER, G.; PFEILSCHIFTER, J.; KUNZ, D. Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-g-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n.26, p. 16679-16687, 1997.

WALLERATH, T.; WITTE, K.; SCHÄFER, S. C.; SCHWARZ, P. M.; PRELLWITZ, W.; WOHLFART, P.; KLEINERT, H.; LEHR, H. A.; LEMMER, B.; FÖRSTERMANN, U. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. In: **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 13357-13362, 1999.

WATANABE, A.; YAGI, Y.; SHIONO, H.; YOKOMIZO, Y. Effect of intramammary infusion of tumour necrosis factor- $\alpha$  on milk protein composition and induction of acute-phase protein in the lactating cow. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, p. 653-662, 2000.

WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 221-232, 2000.

WATSON, E. D.; THOMSON, S. R. M. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, n. 2, p. 106-110, 1996.

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, p. 107-121, 1987a.

WATSON, E. D.; STOKES, C. R.; BOUME, F. J. Influence of arachidonic acid metabolites *in vitro* and in uterine washings on migration of equine neutrophils under agarose. **Research in Veterinary Science**, v. 43, p. 203-207, 1987b.

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

WEBEL, D. M.; FINCK, B. N.; BAKER, D. H.; JOHNSON, R. W. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide, **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1514-1520, 1997.

WEINBERG, E. D. Infection and iron metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 30, p. 1485-1490, 1977.



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

WERDAN, K. Supplemental immune globulins in sepsis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 37, p. 341-349, 1999.

WERDAN, K. Intravenous immunoglobulin for prophylaxis and therapy of sepsis. **Current Opinion in Critical Care**, v. 7, p. 354-61, 2001.

WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 3, p. 378-381, 1999.

WIDDERS, P. R.; STOKES, C. R.; DAVID, J. S. E.; BOURNE, F. J. Quantitation of the immunoglobulins in reproductive tract secretions of the mare. **Research in Veterinary Science**, v. 37, p. 324-330, 1984.

WIDDERS, P. R.; WARNER, S.; HUNTINGTON, P. J. Immunisation of mares to control endometritis caused by *Streptococcus zooepidemicus*. **Research in Veterinary Science**, v. 58, p. 75-81, 1995.

WIEGERS, G. J.; REUL, J. M. H. M. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 19, p. 317-321, 1998.

WILCKENS, T.; DE RIJK, R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. **Immunology Today**, v. 18, p. 418-424, 1997.

WINTER, P.; MINY, M.; BAUMGARTNER, W. Interpretation of SAA concentrations in milk from dairy ewes and goats. In: **International colloquium on animal acute phase proteins**. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p. 31, 2005.

WOLF, G.; KIROPES, T. C.; MASUSHIGE, S.; SCHREIBER, J. B.; SMITH, M. J.; ANDERSON, R. S. Recent evidence for the participation of vitamin A in glycoprotein synthesis. **Federation Proceedings**, v. 38, n. 11, p. 2540-2543, 1979.

WOLF, C. A.; MALSCHITZKY, E.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Effect of corticotherapy on the proteomics of the endometrial fluid from mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. Enviado para publicação, 2011.

WU, C. Y.; SARFATI, M.; HEUSSER, C.; FOURNIER, S.; RUBIO-TRUJILLO, M.; PELEMAN, R.; DELESPESE, G. Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4- stimulated human lymphocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 3, p. 870-877, 1991.

WU, W.; GAO, Q.; CHEN, J.; YE, J.; QIAN, Y.; LI, J.; LU, H.; MENG, Z.; NI, C.; ZHONG, B. Analysis of two-dimensional gel electrophoresis images of protein from posterior silk gland of silkworm (*Bombyx mori*) on day 1 and day 4 in the 5th Instar stage. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 2, p. 249-254, 2007.

YAMASHITA, K.; FUJINAGA, T.; OKUMURA, M.; TAKIGUCHI, M.; TSUNODA, N.; MIZUNO, S. Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 53, n. 6, p. 1019-1024, 1991.

YATES-SIILATA, K. E.; DAHMS, T. E.; WEBSTER, R. O.; HEUERTZ, R. M. C-reactive protein increases F-actin assembly and cortical distribution with resultant loss of lamellipod formation in human neutrophils. **Cell Biology International**, v. 28, p. 33-39, 2004.

YOUNG, C.R.; ECKERSALL, P.D.; SAINI, P.K.; STANKER, L.H. Validation of immunoassays for bovine haptoglobin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 49, p. 1-13, 1995.

YUKAWA, H.; SHEN, J.; HARADA, N.; CHO-TAMAOKA; H.; YAMASHITA, T. Acute effects of glucocorticoids on atp-induced  $ca^{2+}$  mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 130, p. 485-496, 2005.

ZENT, W. W.; TROEDSSON, M. H. T.; XUE, J-L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: A field study. In: **Proceedings of the Annual Meeting for The Society for Theriogenology**, 78-79, 1998.

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

ZHANG, N.; TRUONG-TRAN, Q. A.; SCHLEIMER, R. P. Selective effects of glucocorticoids on epithelial responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, p. S12, 2005.

ZHANG, N.; TRUONG-TRAN, Q. A.; TANCOWNY, B.; HARRIS, K. E.; SCHLEIMER, R. P. Glucocorticoids Enhance or Spare Innate Immunity: Effects in Airway Epithelium Are Mediated by CCAAT/Enhancer Binding Proteins. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 578-589, 2007.

ZIGMOND, S. H. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. **Journal of Cell Biology**, v. 75, p. 606-616, 1977.

ZSILA, F. Inhibition of heat- and chemical-induced aggregation of various proteins reveals chaperone-like activity of the acute-phase component and serine protease inhibitor human  $\alpha$ 1-antitrypsin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 242-247, 2010.

APÊNDICE A – Sequência de peptídeos da  $\alpha_1$ -antitripsina

```

 1 MPSSVTWCLL LLAGLCCLVP SSLAEDLQGD AVPERHATKD DNEHPQEPAE
51 HKIAPNLADF AFSLYRHVAH QSNTTNIFFS PVSIAATAFAL LSLGAKGDTH
101 TQILEGLRFN LTELAEAQIH DGFQHLLNAL NHSDNQLQLT TGNGLFIDKT
151 LKLVDFQED VKNLYHSEAF SINFGDIEEA KKQINDYVEN GTQGKIVDLV
201 KDLDKDTVLA LVNYIFFKGG WEKPFEPES TEQDFHVDEK TTVRVPMMHR
251 LSSFVQYSD TLSSWVLLLD YAGNATAFFI LPDQGKLRHL EDTLTKGILA
301 TFLNRHSRY ANVSLPKLSI SGCYDLKRIL PELGITKVFS LEADLSGIAE
351 ETSLTVSKAL HKAVLTIDEK GTEAAGATIV EAIRTLLHTN VEFNRPFVLI
401 IYDRNTKSPL FVGKVVDPTQ K

```

Cobertura em 26% de peptídeos equivalentes, destacados em negrito.

## APÊNDICE B – Sequência de peptídeos da Haptoglobina

1 MSALGAVVAL LLWGQLFAVD TGNEATDFTD DSCPKEPEIP NGYVEHLVRY  
 51 QCKNYRLRS EGDGVYALNS EKQWVNKASG TKLPECEAVC GKPKNPVDQV  
 101 **QRIIGGLLDA KGSFPWQAKL VSRHNLTTGA TLISEQWLLT TAQNLFNLHT**  
 151 **PDAKPKDIAP TLKLYVGRKQ PVEIEKVVVFH PDYQEVDIGL IKLKEKVPVG**  
 201 **ERVMPICLPS KDYAQVGRVG YVSGWGRNAN FNFTELLKYV TLPVADQDTC**  
 251 **VKHYESGTVP EKKTNRSSVG VQPILNEHTF CAGLSKFQED TCYGDAGSAF**  
 301 VIHDEEDDTW YAAGILSFDK SCAVAEYGVY VKVPSILDWV QKTIAEN

Cobertura em 14% de peptídeos equivalentes, destacada em negrito.

## APÊNDICE C – Sequência de peptídeos da Transtiretina

1 MASHHLLLLC LAGLVFASEA GPAGAGESKC PLMVKVLDV **RGSPAANVDV**  
51 **KVFKKA**ADET WELFASG**KTS EFGELHGLTT DEKFVEGIYK VELDTK**SYWQ  
101 SLGISPFHEY AEVVFTANDS GPRRY**TIAAL LSPYSYSTTA LVS**NPKE

Cobertura em 40% de peptídeos equivalentes, destacada em negrito.

## APÊNDICE D – Sequência de peptídeos da Apolipoproteína A-1

1 MKAVVLTAV LFLTGSQARH FWQGDEPQSS WDR**VKDLATV** **YDAVK**DSGR  
51 **EYVAQFEASA** **LGKQLNLKLL** DNWDSLGTTL GKLREQLGPV TQDFWDKLEK  
101 DTEGLRQELN KDLELVKQKV QPYLDDFQKK **WQEEVEVYRQ** **KVAPLSDEFR**  
151 EGARQKWQEL HE**LTP**LAEE **MRDRLRTHVE** SLRVNLAPFS **EELRQRLASR**  
201 LQAL**KDGGGA** **SLAEYHSKAS** EHLKALSEKA **HPALEDLRQG** LLPVLES**LKA**  
251 **SFLAAIDEAS** **KQLTPQ**

Cobertura em 37% de peptídeos equivalentes, destacada em negrito.

## APÊNDICE E– Sequência de peptídeos da Transferrina

1 MRLAIRALLA CAVLGLCLAE QTVRWCTVSN HEVSKCASFR DSMKSIVPAP  
 51 PLVACVKRTS YLECIKAIAD NEADAVTLDA GLVFEAGLSP YNLKPVVAEF  
 101 YGSKTEPQTH YYAVAVVKKN SNFQLNQLQG KKSCHTGLGR SAGWNIPIGL  
 151 LYWQLPEPRE SLQKAVSNFF AGSCVPCADR TAVPNLCQLC VGKGTDKCAC  
 201 SNHEPYFGYS GAFKCLADGA GDVAFVKHST VLENLPQEAD RDEYQLLCDR  
 251 NTRKSVDEYK DCYLASIPSH AVVARSVDGK EDLIWGLLNQ AQEHFGTEKS  
 301 KDFHLFSSPH GKDLLFKDSA LGFLRIPPAM DTWLYLGYEY VTAIRNLRED  
 351 IRPEVPKDEC KKVWCAIGH HEKVKCDEWS VNSGGNIECE SAQSTEDCIA  
 401 KIVK**GEADAM SLDGGFIYA GK**CGLVPVLA ENYETRSGSA CVDTP EEGYH  
 451 AVAVVKSSSD PDLTWNLSKG KKSCHTGVDR TAGWNI PMGL LYSEIKHCEF  
 501 DKFFREGCAP GYRRNSTLCN LCIGSASGPG RECEPNNHER YGYTGAFRC  
 551 LVEK**GDVAFV KHQTVEQNTD** GRNPDDWAKD **LKSENFK**LLC PDGTRKSVTE  
 601 FKSCYLAR**AP NHA**VVSRKEK AACVCQELHN QQASYGKNGS HCPDKFCLFQ  
 651 SATKDLLFRD DTQCLANLQP TTTYK**TYLGE KY**LTAVANLR QCSTSRLL EA  
 701 CTFHRV

Cobertura em 6% de peptídeos equivalentes, destacada em negrito.



## APÊNDICE F – Sequência de peptídeos da IgG

1 ASTTAPKYFQ LTPSCGITS D ATVALGCLVS DYYPEPVTVS WNSGALTSGV  
51 HTFPSVLQSS GLYALSSMVT VPASTWTSET YICNVAHPAS STKVDRIPP  
101 CVLSAEGVIP IPSVPKPQCP PYTHSKFLGG PSVFI FPPNP **KDALMISRTP**  
151 VVTCVVVNL DQYPDVQFSW YVDNTEVHSA ITKQREAFN STYRVVSVLP  
201 IQHQDWLSGK EFKCSVTNMG VPQPISRALS RGKGPSR**VPQ** **VYVLPHPDE**  
251 **LAK**SKVSVTC LVKDFYPPDI SVEWQSNRWP ELEGKYSTTP AQLDGDGSYF  
301 LYSK**LSLETS** **RWQQVESFTC** AVMHEALHNNH FTKTDISESL GK

Cobertura em 8% de peptídeos equivalentes, destacada em negrito.

## APÊNDICE G – Sequência de peptídeos da Actina

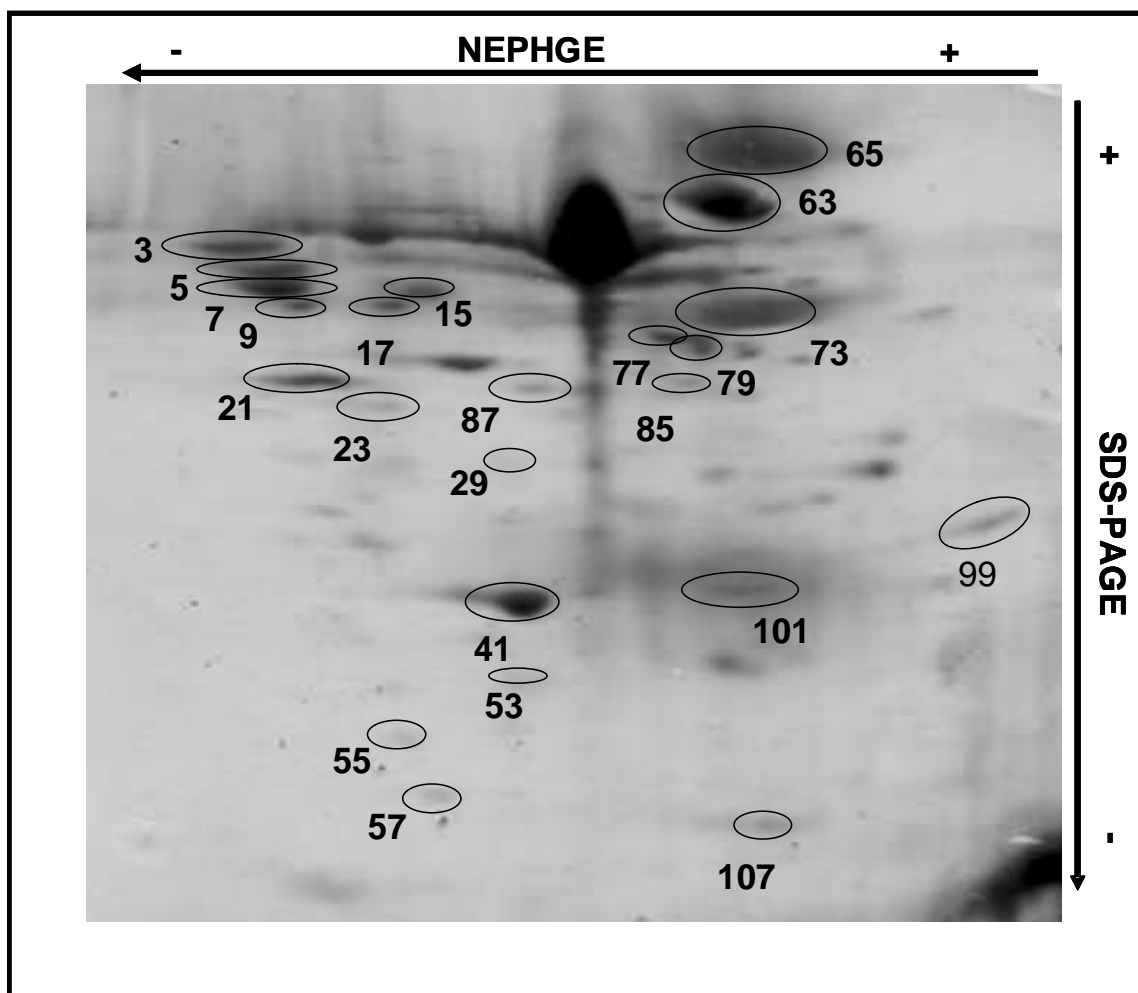
1 MDDDIAALVV DNGSGMCK**AG** **FAGDDAPRAV** **FPSIVGRPRH** **QGVMVGMGQK**  
 51 **DSYVGDEAQS** **KRGILTLKYP** IEHGIVTNWD DMEKIWHHTF YNELRVAPEE  
 101 **HPVLLTEAPL** **NPKANREKMT** QIMFETFNTP AMYVAIQAVL SLYASGR**TTG**  
 151 **IVMDSGDGVT** **HTVPIYEGYA** **LPHAILRLDL** AGRDLTDYLM KILTER**GYSF**  
 201 **TTAEREIVR** DIKEKLCYVA LDFEQEMATA ASSSSLEK**SY** **ELPDGQVITI**  
 251 **GNERFRCPEA** LFQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR **KDLYANTVLS**  
 301 **GGTTMYPGIA** **DRMQKEITAL** **APSTMKIKII** **APPERKYSVW** IGGSILASLS  
 351 TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF

Cobertura em 42% de peptídeos equivalentes, destacada em negrito.

APÊNDICE H – Esquema das interações das 23 bandas protéicas significativas nos quatro tratamentos: aumento (↑) ou diminuição (↓) em relação à densidade óptica relativa e à frequência.

	<b>Varição nº bandas</b>	<b>Banda protéica no gel (proteína identificada)</b>
<b>Densidade óptica relativa</b>	<b>16</b>	
Controle x GC	0	
Controle x Infectado	8	↑ 15, 23 (Hp), 53 (ApoA-1), 77 (IgG), 99, 107 ↓ 65 (TF), 73
GC x Infectado + GC	11	↑ 3, 5, 7, 9 (AAT), 15, 29 (TT), 53 (ApoA-1), 55, 87 (actina), 107 ↓ 65 (TF)
Infectado x Infectado + GC	6	↑ 3, 5, 7 (AAT), 85, 87 (actina) ↓ 77 (IgG)
<b>Frequência</b>	<b>15</b>	
Controle x GC	4	↑ 17, 41, 73, 79
Controle x Infectado	5	↓ 3, 5, 7, 9 (AAT), 29 (TT)
GC x Infectado + GC	6	↑ 3, 5 (AAT), 29 (TT), 85 ↓ 21, 63
Infectado x Infectado + GC	9	↑ 3, 5, 7 (AAT), 29 (TT), 17, 41, 57, 101, 107

APÊNDICE I – Gel 2D SDS-PAGE com as 23 bandas protéicas significativas



Persistent post-breeding endometritis: effect of corticosteroid treatment on the number of protein bands from uterine endometrial fluid of susceptible mares.

Pferdeheilkunde 26 (2010) 1 (Januar/Februar) 22-24

## Persistent post-breeding endometritis: effect of corticosteroid treatment on the number of protein bands from uterine endometrial fluid of susceptible mares

Caroline A. Wolf<sup>1,2</sup>, Eduardo Malschitzky<sup>3</sup>, Gabriel M. Davolli<sup>1</sup>, Maria Inês M. Jobim<sup>2</sup> and Rodrigo C. Mattos<sup>1</sup>

ReproLab, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul (Brazil)<sup>1</sup>, Laboratory of semen technology and proteins related to animal reproduction, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul (Brazil)<sup>2</sup> and Lutheran University of Brazil (Brazil)<sup>3</sup>

### Summary

The aim of this study is to compare the number of endometrial fluid protein bands (protein profile) of mares susceptible to persistent post-breeding endometritis (PPBE), infected or non-infected with bacteria *Streptococcus zooepidemicus*, treated with an steroidal anti-inflammatory drug with the ones from non-treated mares. This study was conducted from January 2008 to March of 2009. During estrus, pure endometrial fluid of 16 cyclic Warmblood mares was recovered by the use of vaginal tampons for specimen collection. Four groups were constituted: G1 - Control, G2 - treated with 20mg isoflupredone acetate, every 12h, for 3 days, G3 - experimental infection with *Streptococcus zooepidemicus* and G4 - experimental infection with *Streptococcus zooepidemicus* and treated with corticosteroid treatment (same as in G2). Samples were processed and submitted to two-dimensional electrophoresis technique according to O'Farrel (1977), modified by Rodnight et al. (1988). Electrophoresis gels were scanned and analyzed to determine the number of endometrial protein bands. Endometrial electrophoresis gels showed 33 protein bands in G1, 54 in G2, 51 in G3 and 72 in G4. Protein spots ranged from 15 to 105 kDa molecular weights and pH 4.3 to 10.0 isoelectric points. An increase in the number of protein bands was observed in the two corticosteroid treated groups (G2 and G4). Treatment with steroidal anti-inflammatory drug isoflupredone can alter the number of endometrial fluid protein profile of estrus mares susceptible to PPBE, by an increase in the number of protein bands.

**Keywords:** Reproduction, endometritis; corticosteroid; equine; endometrial fluid; proteins; electrophoresis

### Die nach der Belegung persistierende Endometritis: Zum Effekt einer Kortikosteroidbehandlung auf die Anzahl der Proteinbanden in der endometrialen Flüssigkeit bei empfänglichen Stuten

Ziel der Studie ist es, die Anzahl der Proteinbanden (Proteinprofil) im Uterussekret von Stuten vergleichen, die empfänglich sind für eine nach der Belegung persistierende Endometritis, infiziert bzw. nicht infiziert wurden mit *Streptococcus zooepidemicus*, und mit einem steroidal Antiphlogistikum behandelt wurden oder unbehandelt blieben. Die Studie wurde von Januar 2008 bis März 2009 durchgeführt. Während der Rösse erfolgte die Gewinnung reinen Uterussekrets von 16 zyklischen Stuten mithilfe eines Vaginaltampons. Vier Gruppen wurden gebildet: G1: Kontrolle; G2: Behandlung mit 20mg Isoflupredonazetat, täglich über 3 Tage; G3: experimentelle Infektion mit *Streptococcus zooepidemicus*; G4: experimentelle Infektion mit *Streptococcus zooepidemicus* und Kortikosteroidbehandlung (wie G2). Die Proben wurden aufgearbeitet und eine zweidimensionale Elektrophorese nach O'Farrel (1977), modifiziert nach Rodnight et al. (1988) durchgeführt. Die Elektrophoresegele wurden gescannt und analysiert, um die Anzahl der Proteinbanden zu bestimmen. Die endometrialen Elektrophoresegele zeigten in G1 33, in G2 54, in G3 51 und G4 72 Proteinbanden. Die Proteinspots lagen zwischen 15 und 105 kDa Molekulargewicht und bei einem isoelektrischen Punkt zwischen pH 4,3 und 10,0. Ein Anstieg der Proteinbandenanzahl wurde in den beiden Gruppen mit Kortikosteroidbehandlung (G2 und G4) beobachtet. Die Behandlung mit dem steroidal Antiphlogistikum Isoflupredon führt zu einer Veränderung des Proteinprofils im Uterussekret bei Stuten, die empfänglich sind für eine nach der Belegung persistierende Endometritis durch einen Anstieg der Anzahl der Proteinbanden.

**Schlüsselwörter:** Reproduktion, Endometritis, Kortikosteroid, Pferd, Uterussekret, Proteine, Elektrophorese

### Introduction

Endometritis is a normal physiological event that occurs after mating (Watson 2000) due to a response induced by semen deposited into the mare uterine lumen (Kotilainen et al. 1994, Fiala et al. 2007). This inflammatory reaction removes excessive semen and bacterial contamination inoculated at the time of breeding (Kotilainen et al. 1994, Troedsson et al. 1995, Fiala et al. 2007).

However, if inflammation persists, the resulting environment is not compatible with the establishment of pregnancy (Watson 2000). Mares that fail to clear the inflammation within the first 36 hours after mating and accumulate fluid in the uterine

lumen (LeBlanc 2003) are classified as susceptible and are believed to have an impaired physical clearance of the uterus. Accumulation of uterine fluid during estrus was associated with compositional changes in the uterine secretions. The mean total protein concentration in the uterine secretion of mares with IUF was one-third of that found in mares without this condition. This presumably indicates that uterine fluid is composed of both glandular secretions and of a transudate (Reilas 2001). It has been described that corticosteroid treatment, before breeding, increases the pregnancy rates of susceptible mares (Dell'Aqua Jr. 2006). The aim of this study is to compare the number of endometrial fluid protein bands (protein profile) of mares susceptible to PPBE, infected or non-infected with bacte-



ria *Streptococcus zooepidemicus*, treated with a steroidal anti-inflammatory drug, with the ones from non-treated mares.

## Materials and Methods

The study was conducted from January to March of 2008/2009. A total of 16 cyclic susceptible Warmblood mares, aged between 4 and 30 years, from an experimental herd entered the study. Animals were kept in fields, pastured and supplemented with oats and hay.

### Mare's selection

Mares were examined for reproductive soundness, including evaluation of perineal conformation, transrectal palpation and ultrasonographic examinations of the reproductive tract. Only clinically normal mares were used. Mares were examined by means of palpation and ultrasonography per rectum, daily, in order to evaluate follicular growth, grade of uterine edema and presence of intrauterine fluid accumulation (IUF). Mares were classified as susceptible to PPBE according to historical data of previous studies. Mares were considered susceptible when IUF was detected by ultrasonographic examination of the uterus 48 hours after an induced uterine inflammation caused by semen deposition after insemination.

### Treatment and experimental infection

After animal selection, the experiment began when a pre-ovulatory follicle (> 35 mm) and a characteristic ultrasonographic image of estrus uterus were observed. All mares underwent the four groups that were constituted and had an interval of one estrus between treatments. Groups were: G1 (n=8) Control: first estrus of the experiment, mares did not receive any treatment. G2 (n=8) Treated: third estrus, mares were administered with 20 mg isoflupredone acetate, every 12h, for 3 consecutive days. G3 (n=8) Infected: fifth estrus, mares were inoculated with  $1 \times 10^9$  *Streptococcus zooepidemicus* and G4 (n=4) Infected + Treated: seventh estrus, mares were inoculated with  $1 \times 10^9$  *Streptococcus zooepidemicus* and received corticosteroid treatment, same as in G2. Bacteria were inoculated at the second day of treatment. Experimental infection was performed by the infusion of a bacterial culture suspended in 20 ml saline solution from an insemination pipette into the uterus. All mares were treated with uterine lavage and local infusion of antibiotics until confirmed free of uterine inflammation. Additionally, it is relevant to report that in some occasions, at sample collection, insufficient volume was recovered because some mares did not produce enough endometrial fluid. These samples were not considered in the study. Also, one mare developed permanent endometritis after infection. The endometritis did not respond to medical treatment until the mare entered seasonal anestrus, therefore this mare was carried out from the experiment.

### Sample collection and processing

Samples were collected 12h latter by the use of a cotton tampon (mini OBâ – Johnson & Johnson) aseptically inserted into the uterus. The technique used for sample collection was a modification of the procedure described by Reilas (2001). A 50 cm umbilical tape was attached to the tampon, which was then passed through the cervix into the uterus using a modi-

fied doubleglove technique. The distal part of a rectal glove was cut off from the wrist to make a plastic tube. The gloved hand with the tampon was placed inside the tube, and then closed by gathering its end with one's fingers. The gloved hand was set free from the plastic tube before reaching the cervix. The tampon was kept in the uterus for 30 min and withdrawn from the uterine lumen protected by a gloved hand. After tampon removal, each tampon was placed inside a 20 ml syringe, and the absorbed fluid was squeezed out into a sterile plastic tube. An aliquot of 2.0 ml of endometrial secretion was centrifuged at  $1500 \times g$  for 15-20 minutes. The supernatant was transferred into cryovials and stored in liquid nitrogen until assay.

### Electrophoresis

Frozen samples were thawed, recentrifuged at  $10.000 \times g$  for 60 min at 4°C and a 50 µL aliquot of the supernatant was taken and transferred into cryovials for storage at -80°C. Protein concentration was assessed according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard. Endometrial samples from two mares had insufficient protein content and were not considered suitable to perform electrophoresis. Endometrial secretion samples were subjected (in duplicate) to the two-dimensional gel electrophoresis technique described by O'Farrel (1977) and modified by Radnight (1988). Gels were immersed in a solution of 0.15% Coomassie brilliant blue R-250 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 53% methanol, 7% acetic acid and water, and were stained overnight. The gels were destained in a mixture of 50% methanol, 7% acetic acid and water, with a minimum of five solution changes per gel. Destained gels were equilibrated in a mixture of 50% methanol, 1% glycerol and water, for 2 h. The gels were then placed between two cellophane sheets until dry. After drying, gels were scanned (Hewlett-Packard 6100C, Palo Alto, CA, USA) and analyzed using a software (Optiquant Acquisition & Analysis, version 02.00, Canberra, Australia) to determine the number of endometrial protein bands.

## Results

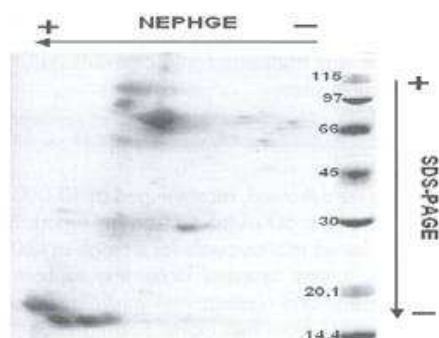
Endometrial samples from 16 mares were collected and a total of 40 gels from susceptible mares were used. Protein spots ranged from 15 to 105 kDa molecular weight and isoelectric point (Ip) from 4.3 to 10.0 (Figure 1). Endometrial electrophoresis gels showed 33 protein bands in G1, 54 in G2, 51 in G3 and 72 in G4.

## Discussion

An increase of protein bands was observed in this study, in the two corticosteroid treated groups (G2 and G4). This increase may be explained by the presence of anti-inflammatory proteins (such as some anti-inflammatory cytokines), caused by the well-known potent corticosteroid anti-inflammatory action. Malschitzky et al. (2008) observed higher optic density and frequency in 12 and 8 protein bands, respectively, in samples from susceptible mares, when compared to resistant mares. In 11 spots was possible to see a relationship with some proteins that have already been reported in horses, from which 6 may be involved in the inflammatory process. Fumoso et al. (2003) reported that susceptible mares in estrus presented higher levels of mRNA



expression for 4 pro-inflammatory cytokines (IL-1, TNF-, IL-6 and IL-8) before breeding, when compared to resistant mares. The presence and concentration of nitric oxide (NO), 13 hours after artificial insemination was observed by Alghamdi and Troedsson (2002), which demonstrated that total NO was significantly higher in susceptible than resistant mares. Nitric oxide is a main mediator of smooth muscle relaxation in different organs, including the uterus. Therefore, high levels of NO in the uterine secretion of susceptible



**Fig. 1** Example of a two-dimensional polyacrylamide gel of endometrial secretion proteins, from Control group. Two-dimensional 12% SDS-PAGE gel stained with Comassie blue. The horizontal arrow on the top shows the direction of the non-equilibrated pH gradient (NEPHGE) from the basic end (+) to the acid end (-), in the first dimension. The molecular weight marker (ladder) is to the right. *Beispiel eines zweidimensionalen Polyacrylamidgels von endometrialen sekretorischen Proteinen aus der Kontrollgruppe. Das zweidimensionale SDS-PAGE-Gel wurde mit Comassie-Blau gefärbt. Der horizontale obere Pfeil zeigt die Richtung des equilibrierten pH-Gradienten (NEPHGE) vom sauren (+) zum basischen (-) Ende in der ersten Dimension. Rechts ist aufsteigend das Molekulargewicht aufgezeigt.*

mares may be a cause or an effect of their susceptibility. Resistant mares are capable to completely eliminate inflammatory products as soon as they are generated, while susceptible mares fail to spontaneously do so, because of their pendulous uteri suspended deeply in the abdominal cavity, resulting in an accumulation of NO (Alghamdi and Troedsson 2002). Consequently, the myometrium fails to contract and inflammatory products accumulate acting as a continuous stimulus to persistent endometritis. The use of prednisolone close to the time of ovulation, resulted in a higher pregnancy rate of susceptible mares compared to non-treated mares (Dell'acqua Jr. et al. 2006). Corticosteroids promote a reduction in the expression of several inflammatory cytokines, such as IL-1, TNF-, IL-4, IL-3, IL-5 and IL-8, thus reducing inflammation. Also, the administration of corticosteroids reduces the levels of NO and enzymes responsible for the synthesis of prostaglandins and leukotrienes and decreases the activity of adhesion molecules, which reduces the migration of leucocytes from blood vessels (Janeway et al. 1999).

Another conjecture is that some of the proteins present in the endometrial fluid after corticosteroid treatment do not have specific roles during the inflammatory process, but other functions not clear to us yet. Nevertheless, anti-inflammatory cytokines were expected to arise to control pro-inflammatory cytokines expression in the uterine environment of susceptible mares, in an attempt to bring balance to their impaired immunological system.

In conclusion, treatment with steroidal anti-inflammatory drug isoflupredone can alter the number of endometrial fluid protein profile of mares susceptible to PPBE, during estrus, promoting an increase in the number of protein bands. Further studies are necessary to identify inflammatory proteins and to elucidate their role, associated, if ever, to corticosteroid treatment.

## Acknowledgements

The authors are thankful to CNPq for the support of this study.

## References

- Alghamdi A. S. and M. H. T. Troedsson (2002) Concentration of nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis. *Theriogenology* 58, 445-448
- Dell'acqua Jr. J. A., F. O. Papa, M. D. Lopes, M. A. Alvarenga, L. P. Macedo and C. M. Melo (2006) Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Animal Reprod. Sci.* 94, 270-273
- Fiala S. M., C. A. Pimentel, A. L. G. Mattos, R. M. Gregory and R. C. Mattos (2007) Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology* 67, 556-562
- Fumuso E., S. Giguère, J. Wade, D. Rogan, I. Videla-Dorna and R. A. Bowden (2003) Endometrial IL-1b, IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA transcriptions in mares resistant or susceptible to persistent post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96, 31-41
- Janeway C. A., P. Travers and M. Walport (1999) *Immunobiology*, Fourth edition, Current Biology Publications, London, 635 pp
- Kotilainen T., M. Huhtinen and T. Katila (1994) Sperm-induced leucocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* 41, 629-636
- LeBlanc M. M. (2003) Persistent Mating Induced Endometritis. In: Robinson, N.E. *Current Therapy in Equine Medicine 5*. Philadelphia, W.B. Saunders. 234-237
- Lowry O.H., J. W. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Malschitzky E., S. Fiala, A. T. Esmeraldino, A. P. Neves, P. Garbade, M. I. M. Jobim, R. M. Gregory and R. C. Mattos (2008) Persistent mating-induced endometritis susceptibility: The role of uterine secretion. *Pferdeheilkunde* 24, 74-78
- O'Farrell P. Z., H. M. Goodman and P. H. O'Farrell (1977) High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12, 1133-1142
- Reilas T. (2001) Uterine luminal environment of the mare. Academic Dissertation (Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki), 391 pp
- Rodnight R., R. Zamani and A. Tweedale (1988) An investigation of experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. *J. Neurosci. Meth.* 24, p. 27-38
- Troedsson M. H. T., B. N. Steiger, M. N. Ibrahim, D. N. Foster and B. G. Crabo (1995) Mechanism of sperm induced endometritis in the mare. *Biology of Reproduction (Suppl.)* 52, 307-307
- Watson E. D. (2000) Post-breeding endometritis in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 60, 221-232

R. C. Mattos  
ReproLab  
Departamento de Medicina Animal  
FAVET-UFRGS  
Av. Bento Gonçalves 9090  
91540-000 Porto Alegre-RS  
Brazil  
rcmattos@ufrgs.br