

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**EFEITO DA DEXAMETASONA NA PROTEÔMICA DO FLUIDO
ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS A ENDOMETRITE**

TAMARINI RODRIGUES ARLAS

**PORTO ALEGRE
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**EFEITO DA DEXAMETASONA NA PROTEÔMICA DO FLUIDO
ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS A ENDOMETRITE**

TAMARINI RODRIGUES ARLAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: equinos da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina Animal.

Orientador: RODRIGO COSTA MATTOS

Co-Orientadora: CAROLINE ANTONIAZZI WOLF

**PORTO ALEGRE
2014**

TAMARINI RODRIGUES ARLAS

**EFEITO DA DEXAMETASONA NA PROTEÔMICA DO FLUIDO
ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS A ENDOMETRITE**

APROVADO POR:

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Orientador e Presidente do PPGMA-Equinos

Prof. Dr. Carlos Wayne Nogueira
Membro da comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da comissão

Prof. Dr. Marco Alvarenga
Membro da comissão

A minha mãe, minha jóia mais preciosa. Por ser a luz do meu caminho, sempre ao meu lado me incentivando e nunca me deixando desistir.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, pela dedicação e apoio nos momentos difíceis. Tudo que sou hoje devo exclusivamente a ti, te amo muito.

Ao meu orientador e amigo, Rodrigo Costa Mattos, pela paciência, ajuda e ensinamentos.

Á todos os estagiários do Laboratório de Reprodução Animal-UFRGS (REPROLAB), que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Diego, pelo apoio, compreensão e muita paciência.

Aos meus amigos, Bianca Petrucci Rocha e Henrique Bastos, por toda amizade, companherismo e pelos melhores momentos divididos.

Á Caroline Wolf, inúmeros agradecimentos.

Á Anita Pimentel, pela ajuda nas correções.

Ao CNPQ, CAPES e FAPERGS por financiarem este experimento.

Por fim, a todos meus amigos, obrigada.

RESUMO

EFEITO DA DEXAMETASONA NA PROTEÔMICA DO FLUIDO ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS A ENDOMETRITE

Tese de doutorado

Autor: Tamarini Rodrigues Arlas

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Co-orientadora: Caroline Antoniazzi Wolf

A corticoterapia tem sido utilizada frequentemente nas éguas suscetíveis. O uso de isoflupredona melhora a taxa de prenhez e altera o perfil proteico do líquido endometrial em relação a éguas não tratadas. A utilização de dexametasona diminui o acúmulo de líquido pós-cobertura, reduz o edema do útero, porém, desconhecem-se seus efeitos no perfil proteico do líquido endometrial. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da dexametasona em éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura sobre perfil proteico do líquido endometrial na presença ou ausência de infecção. Nove éguas suscetíveis foram utilizados, com idade entre 7 a 30 anos. Após a verificação dos sinais de estro as éguas foram submetidas a quatro tratamentos: (C) éguas não receberam nenhum tipo de tratamento e serviram como controle; (D) éguas receberam 40mg de dexametasona (IV), no momento da cobertura, com coleta da amostras após 6 horas, (I-6 e I-24) infusão intra-uterina de 1×10^9 de *S. zooepidemicus*/mL, com coleta da amostra após 6 e 24 horas; (I/D-6 e I/D-24) infusão intra-uterina de 1×10^9 *S. zooepidemicus*/mL e administração de 40mg de dexametasona (IV), com coleta da amostra após 6 e 24 horas. Todas as éguas foram submetidas a todos os tratamentos. As amostras foram coletadas e submetidas à eletroforese bi-dimensional para separação proteica e espectrometria de massa para a identificação das bandas proteicas relevantes. A corticoterapia provocou alteração na proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis, caracterizada pelo aumento (TTR) e/ou diminuição (ApoA1) na densidade óptica de proteínas da fase aguda da inflamação. Conclui-se que a utilização da dexametasona em éguas com e sem presença de infecção altera a proteômica do fluido endometrial de éguas suscetíveis. Sugere-se que a dosagem ou a frequência de aplicação da dexametasona deva ser aumentada.

Palavras-chave: equinos, glicocorticoides, transtiretina, albumina, actina, apolipoproteina A1.

ABSTRACT**EFFECT OF DEXAMETHASONE ON PROTEOMICS OF ENDOMETRIAL FLUID FROM MARES SUSCEPTIBLE TO ENDOMETRITIS**

Thesis

Author: Tamarini Rodrigues Arlas

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

Co-Adviser: Caroline Antoniazzi Wolf

Corticotherapy has often been used in susceptible mares. The use of isoflupredona improves pregnancy rate and alters the protein profile of the endometrial fluid in relation to untreated mares. The use of dexamethasone decreases the post breeding fluid accumulation, reduces the uterine edema, however is unaware of its effects on the protein profile of endometrial fluid. The aim of the present study was analyze the effect of dexamethasone in mares susceptible to post-breeding persistent endometritis on the protein profile of endometrial fluid in the presence or absence of infection. Nine susceptible mares were used, aged 7-30 years old. After checking the signs of estrus, mares were subjected to four treatments: (C) mares received no treatment and served as controls; (D) mares received 40 mg of dexamethasone at breeding time, with collection of samples after 6 hours; (I-6 and I-24) intrauterine infusion of 1×10^9 *S. zooepidemicus*/ml and the sample was collected after 6 and 24 hours; (I/D-6 and I/D-24) intrauterine infusion of 1×10^9 *S. zooepidemicus*/ml and 40 mg of dexamethasone administration, collecting the sample after 6 and 24 hours. All of the mares were subjected to all treatments. Samples were collected and subjected to two-dimensional electrophoresis for protein separation and mass spectrometry for the identification of relevant protein bands. Corticotherapy resulted in alteration of the protein profile of the endometrial fluid of susceptible mares, characterized by an increase (TTR) and/or decrease (ApoA1) in optical density of the acute phase of proteins of inflammation. We conclude that the use of dexamethasone in mares with and without the presence of infection alters the protein profile of endometrial fluid of susceptible mares. It is suggested that the dosage or frequency of application of dexamethasone should be increased.

Keywords: *horses, glucocorticoids, transthyretin, albumin, actin, apolipoprotein AI.*

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) demonstrando o total das bandas proteicas identificadas, que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e com frequência de identificação nos géis de pelo menos um dos tratamentos superior a 60% 47
- FIGURA 2** Densidade óptica (%) relativa das bandas proteicas identificadas, nos grupos dexametasona (D), infecção+dexametasona 6 horas (I/D-6) e infecção+dexametasona 24 horas (I/D-24) 48
- FIGURA 3** Densidade óptica (%) relativa da banda proteica identificada, nos grupos Dexametasona (D) e Controle (C)..... 48
- FIGURA 4** Densidade óptica (%) relativa das bandas proteicas identificadas, no controle (C), infecção 6 horas (I-6) e infecção 24 horas (I-24)..... 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Análise ontológica das proteínas identificadas no líquido uterino de éguas suscetíveis, que demonstraram diferença significativa entre os tratamentos e frequência de identificação nos géis de pelo menos um dos tratamentos superior a 60%, realizada através da utilização do Strap Database	50
-----------------	---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Processo da inflamação.....	13
2.1.1 Mediadores inflamatório.....	14
2.1.1.1 Neutrófilos.....	14
2.1.1.2 Citocinas.....	14
2.1.1.3 Imunoglobulinas.....	15
2.1.1.4 Sistema do Complemento.....	16
2.1.1.5 Fator de Necrose Tumoral.....	16
2.2 Mecanismos de defesa uterina humorais e celulares	16
2.3 Endometrite	18
2.3.1 Fluido uterino.....	20
2.3.2 Endometrite bacteriana.....	21
2.4 Glicocorticoides	22
2.4.1 Dexametasona.....	24
2.4.2 Modulação da resposta inflamatória.....	25
2.5 Proteínas	27
2.5.1 Proteínas da fase aguda (APP).....	27
2.5.1.1 Albumina.....	29
2.5.1.2 Actina.....	31
2.5.1.3 Apolipoproteína A1.....	32
2.5.1.4 Transtiretina.....	33
2.6 Eletroforese bi-dimensional	34
2.7 Espectometria de Massa	35
3 ARTIGO	37
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Na espécie equina o sêmen é depositado na luz uterina independentemente do modo de cobertura. É neste momento que as barreiras físicas são ultrapassadas pelos espermatozoides, proteínas do plasma seminal e bactérias do sêmen, principalmente *Streptococcus zooepidemicus*, responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997).

A endometrite é um processo infeccioso agudo ou crônico que acomete o endométrio das éguas (KENNEY, 1993). É uma inflamação fisiológica e transitória que serve para limpeza do excesso de espermatozoides mortos e outros contaminantes uterinos formados pela deposição do sêmen (TROEDSSON, 1999). Sendo a enfermidade reprodutiva mais comum relacionada a espécie representando grande perda econômica para os criatórios determinando prejuízos decorrentes da queda da fertilidade, morte embrionária, abortos e descarte de animais (ASBURY, 1987). As infecções uterinas na espécie equina ocorrem frequentemente por alterações nos mecanismos imunológicos de defesa, responsáveis pela eliminação dos microorganismos existentes no útero (RIET-CORREA et al, 1999). Durante o cio, com o favorecimento dos mecanismos de defesa pelo efeito estrogênico, o processo inflamatório está completamente resolvido em 36-48 horas após a cobertura. As éguas nas quais isso ocorre são classificadas como sadias ou resistentes à endometrite persistente pós-cobertura. Porém, se ocorrer uma falha dos mecanismos de defesa, há condições para que as bactérias possam se aderir à mucosa uterina, levando a uma infecção bacteriana e à persistência da inflamação. Nestes casos, a inflamação passa a ser patológica e este quadro é denominado endometrite persistente pós-cobertura (LEBLANC, 2003a).

Diferentes microorganismos tem sido associados à endometrite, com predomínio de agentes de origem bacteriana, especialmente do gênero, *Streptococcus* (RICKETTS et al., 1981), o patógeno mais frequentemente isolado no útero da égua (FERREIRO et al., 1986; UROSEVIC et al. 2010; RICKETTS, 2011). *S. zooepidemicus* para ser capaz de atingir o útero precisa passar por barreiras físicas como a vulva, esfíncter vestibulovaginal e colo do útero. A má conformação interna e externa dos

órgãos reprodutivos podem prejudicar estas barreiras e permitir a entrada da bactéria no útero (WILLIAN, 2003).

O uso da corticoterapia prévia à cobertura tem sido considerada eficaz ao controlar a resposta inflamatória uterina de éguas suscetíveis à endometrite. Inúmeros estudos tem sido propostos (DELL'AQUA Jr. et al., 2006; PAPA et al., 2008; BUCCA et al., 2008; VANDAELI et al 2010; FIORATTI et al 2010; WOLF et al., 2012). Os glicocorticoides têm a capacidade de prevenir ou suprimir as reações inflamatórias, inibindo os fenômenos iniciais do processo inflamatório como a formação do edema, deposição de fibrina, migração leucocitária, dilatação capilar e atividade fagocitária (BEVIER, 1990). A utilização de isoflupredona aumentou as taxas de prenhez em éguas suscetíveis (DELL'AQUA JR. et al., 2006; PAPA et al., 2008) e a administração de dexametasona dose única antes da cobertura levou a uma diminuição do acúmulo de líquido pós cobertura e redução do edema endometrial (BUCCA et al., 2008). O tratamento com acetato de isoflupredona afetou o perfil proteico do líquido endometrial de éguas suscetíveis, durante o estro, promovendo um aumento no número de bandas proteicas (WOLF et al., 2010), sendo os maiores efeitos vistos quando aplicada na presença de um processo infeccioso (WOLF et al., 2012).

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da dexametasona sobre a composição proteica do líquido endometrial de éguas susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura, na presença e na ausência de inflamação uterina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Processo da inflamação

Quando ocorre lesão tecidual, seja causada por bactérias, agentes químicos, calor ou qualquer outro fenômeno, os tecidos lesados liberam várias substâncias que provocam importantes alterações secundárias nos tecidos. Todo o complexo desta alteração tecidual é chamado de inflamação. A inflamação caracteriza-se pela dilatação de vasos sanguíneos locais, com o conseqüente excesso do fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade dos capilares, coagulação do líquido nos espaços intersticiais, migração de grande número de monócitos e granulócitos para os tecidos e pela intumescência das células (GUYTON & HALL, 2006).

Após iniciada essa inflamação, os componentes do plasma e leucócitos são concentrados no local inflamado. Além dos efeitos locais, o foco inflamatório pode dar início a um processo contínuo de resposta de fase aguda sistêmica, que vai desde a síndrome da resposta inflamatória sistêmica até a imunossupressão generalizada. As principais funções dos mediadores são atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência da eliminação do agente agressor (MACKAY, 2000).

Um dos principais desafios na medicina envolvem a detecção e monitoramento da inflamação, resultando no processo de doenças inumeráveis. Para este fim, os esforços têm-se concentrado na identificação bioquímica das proteínas da fase aguda (APPs) como marcadores para o grau e evolução no tempo da inflamação. Em resposta à infecção ou lesão, estas proteínas são rapidamente liberadas para a corrente sanguínea e as suas concentrações estão diretamente relacionados com a gravidade da doença (GABAY & KUSHNER, 1999).

A inflamação é mediada por diferentes mecanismos, que ocorrem em três fases distintas: fase aguda, fase subaguda retardada, onde se nota, predominantemente, a infiltração leucocitária e a fase crônica, onde a proliferação é fator de destaque com a ocorrência da degeneração tissular e da reparação fibrótica. Essas três fases são desejáveis e importantes e podem ser consideradas benignas dentro de padrões em que as atividades celulares e dos mediadores permanecem apropriadamente reguladas e podem ser identificadas por alterações locais notáveis pelos seguintes sinais e sintomas: rubor, calor, tumor e dor (SANTOS JUNIOR, 2003). Em resposta a estímulos

inflamatórios, os neutrófilos fagocitam as bactérias que são mortas rapidamente por enzimas proteolíticas e proteínas antimicrobianas (BRINKMAMM et al., 2004).

Em alguns casos o processo inflamatório agudo não é completamente resolvido, levando à inflamação crônica, como é o caso de doenças autoimunes ou infecções causadas por microrganismos que conseguem evadir a resposta imune. Esse tipo de inflamação acontece quando macrófagos e células T são constantemente ativados, levando ao seu acúmulo nos sítios de lesão e significativo dano tecidual. As citocinas liberadas pelos macrófagos cronicamente ativados estimulam a proliferação de fibroblastos, levando ao aumento da produção de colágeno que culmina na fibrose, característica das inflamações crônicas (BILATE, 2007).

2.1.1 Mediadores Inflamatórios

O processo inflamatório ocorre como uma resposta do tecido à lesão celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, podendo manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, como físico, biológico ou químico. Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (BECKER, 1983).

2.1.1.1 Neutrófilos

A primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de micro-organismos, ocorre nas primeiras horas com os neutrófilos provenientes da corrente sanguínea. Essa migração é determinada por produtos dos tecidos inflamados (GUYTON, 1992). A fagocitose realizada pelo neutrófilo é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra a invasão de microorganismos (LEE & GRINSTEIN, 2004). O aumento da produção de substâncias oxidativas no interior do neutrófilo que ocorre por meio do aumento da atividade respiratória desta célula é fundamental para a adequada eficiência deste processo de defesa (TIZARD, 2000).

2.1.1.2 Citocinas

As citocinas são proteínas secretadas por células reguladoras do sistema imunológico. Apresentam funções reguladoras denominadas linfocinas, monocinas,

interleucinas e interferon, produzidas por várias células que desempenham funções importantes nas respostas fisiológicas e patofisiológicas (ANTUNES, 1992a). Diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação, sendo utilizadas para estimular ou inibir a inflamação, imunidade e hematopoiese (ABBAS et al. 2008). As citocinas são reguladas pela expressão de receptor, receptores antagonistas, proteínas de ligação e por outras citocinas que exercem efeitos opostos (TIZARD, 1996). Algumas citocinas promovem a inflamação e são classificadas como pró-inflamatórias, de modo que outras inibem a ação pró-inflamatória sendo classificadas como anti-inflamatórias. As principais citocinas pró-inflamatórias são IL-1 β e TNF- α , devido a ocorrência nos locais da inflamação e a capacidade em induzir a resposta inflamatória (ELLURU et al., 2006). A síntese de IL-2 é diminuída ou bloqueada por corticosteroides, ciclosporina A e prostaglandinas. A IL-1 e a IL-6 participam de fenômenos inflamatórios e a IL-6 ainda age sobre os hepatócitos induzindo a produção das proteínas de fase aguda. (ANTUNES, 1992b). Durante um processo inflamatório o uso de dexametasona diminui a expressão de mRNA de IL-1 β (WOODWARD et al., 2014). Algumas citocinas, incluindo o TNF, IL-1, IL-1 β , IFN γ , e os glicocorticóides podem influenciar o padrão das proteínas de resposta da fase aguda induzidas por IL-6 (MACKAY, 2000).

As citocinas sintetizadas pelo útero e as células epiteliais do oviduto são secretadas para o lúmen uterino, onde interagem com o desenvolvimento do embrião antes da sua implantação. Várias dessas citocinas são reguladas pela exposição ao sêmen, mostrando através dos quais fluidos seminais podem promover o desenvolvimento e sucesso da implantação do embrião. A principal citocina pós-acasalamento na resposta inflamatória, GM-CSF, tem como alvo a pré-implantação do embrião para aumentar o número de blastômeros viáveis através da inibição da apoptose e regulação da absorção de glicose (ROBERTSON et al., 2001). Outras citocinas visando o desenvolvimento de blastocisto, incluindo IL-6 e de inibição do fator de leucemia, são induzidas após a exposição ao sêmen (ROBERTSON et al., 1992).

2.1.1.3 Imunoglobulinas

Os anticorpos são gama-globulinas denominados de imunoglobulinas que constituem cerca de 20% de todas as proteínas plasmáticas (GUYTON, 1992). As

imunoglobulinas são divididas em cinco classes, IgG, IgA, IgM, IgE e IgD (BERLOT et al., 2007). As imunoglobulinas atuam principalmente de duas maneiras diferentes para proteger o organismo contra os agentes invasores: a primeira por ataque direto ao agente invasor, e a segunda pela ativação do sistema do complemento que, por sua vez, destrói o invasor (ABBAS et al. 2008; GUYTON & HALL, 2006).

2.1.1.4 Sistema do Complemento

O Sistema do Complemento é o mais complexo e eficiente mecanismo de proteção e agressão presente no organismo dos animais vertebrados. A biossíntese do sistema de complemento é aumentada quando se tem uma demanda de diversos componentes, quando estes são "chamados" a participar de processos inflamatórios, de autoagressão e de destruição de microrganismos (ANTUNES, 1992d). Além dos efeitos inflamatórios causados pela ativação dos mastócitos e basófilos, vários outros produtos do complemento também contribuem para a inflamação local. Esses produtos provocam aumento da hiperemia, maior extravasamento capilar de proteínas e coagulação de proteínas nos espaços teciduais, impedindo o deslocamento do microrganismo invasor através dos tecidos (GUYTON, 1992).

2.1.1.5 Fator de Necrose Tumoral

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é o principal mediador da resposta inflamatória aguda á microorganismos infecciosos e é responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves. Os receptores de TNF são membros de uma grande família de proteínas, das quais muitas estão envolvidas na resposta imune e inflamatória. A ligação de citocinas e alguns membros de receptores da família de TNF, leva ao recrutamento de proteínas, chamadas fatores associados aos receptores de TNF (TRAFs) (ABBAS et al. 2008).

2.2 Mecanismos de defesa uterina humorais, celulares e físicos

Os mecanismos de defesa celular (Polimorfonucleares - PMN) e humoral (Imunoglobulinas - Ig) são importantes para auxiliar a limpeza de bactérias e outros contaminantes do útero, mas são ineficazes por si só, se os mecanismos de defesa física não estiverem funcionando adequadamente (WILLIAM, 2003). Para a limpeza física uterina um importante mecanismo para a eliminação rápida do agente agressor e dos

componentes e subprodutos da inflamação é a contratilidade miometrial. Em éguas sadias esta eliminação pode ocorrer nos primeiros 60 minutos após a contaminação (LEBLANC et al., 1994).

Éguas com falha na limpeza uterina muitas vezes sofrem de uma inclinação para frente do útero através da cavidade pélvica. Este pode ser um fator que contribui para o acúmulo anormal de fluido e produtos inflamatórios (LEBLANC et al, 1998). Uma falha no relaxamento do colo do útero durante o estro, ou de drenagem linfática insuficiente, também podem contribuir para esta falha (LEBLANC et al, 1995). As éguas que não conseguem eliminar a inflamação em 36 horas, acumulam líquido no lúmen uterino. Este líquido contém neutrófilos, imunoglobulinas, proteínas, sêmen, bactérias e outros subprodutos da inflamação. A retenção deste líquido resulta em edema intersticial prolongado, sendo que a barreira muco ciliar endometrial pode ser danificada se o fluido no lúmen uterino for persistente. Os vasos linfáticos não podem drenar o edema excessivo ocorrendo o vazamento de líquido em tecidos uterinos. Com o tempo a barreira do endométrio que impede a colonização bacteriana pode ser danificada. O resultado final é um ambiente hostil para o embrião que chega no útero e, em alguns casos, o surgimento de uma endometrite bacteriana (LEBLANC, 2003b). Uma intensa inflamação é uma importante ferramenta de defesa uterina e não deve ser atenuada (KATILA, 2012).

As citocinas, polimorfonucleares, leucócitos e células mononucleares representam uma resposta inflamatória no útero. A inflamação é a primeira linha de defesa e elimina o excesso de espermatozoides e bactérias. A deposição do sêmen provoca uma invasão de PMN em massa, seguido por fagocitose do sêmen auxiliado pela formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos. Sêmen com alta diluição pode resultar em eliminação retardada de PMNs e maior tempo de inflamação (KATILA, 2012). Fiala et al. (2007) observaram que a quantidade de neutrófilos na luz uterina foi maior nas éguas inseminadas com 1 bilhão de espermatozoides do que naquelas inseminadas com menor número, 2 e 4 horas após a inseminação.

A defesa uterina começa com a destruição local de agentes externos por leucócitos, seguido da eliminação e neutralização por anticorpos uterinos e terminando na remoção física dos produtos resultantes, através da drenagem pelo cérvix e pela via linfática (TROEDSSON & LIU, 1995). Os neutrófilos (PMNs) são as primeiras células inflamatórias que entram no lúmen uterino após um estímulo inflamatório (LEHRER et

al, 1988). O útero reage rapidamente à presença do sêmen através de um aporte de neutrófilos, que são identificados 30 minutos após a cobertura (KOTILAINEN et al., 1994). A migração aleatória e direcional de neutrófilos no sangue em éguas suscetíveis é menor do que em éguas resistentes (WATSON et al., 1987).

Na resposta imunitária humoral, as imunoglobulinas são proteínas solúveis sintetizadas na presença de uma substância estranha. São secretadas pelas células plasmáticas, derivadas dos linfócitos B. Cada imunoglobulina tem afinidade específica para o agente estranho que estimulou sua síntese (STRYER, 1992). Várias classes de imunoglobulinas foram isoladas do útero de éguas. Embora medida por anticorpos a defesa uterina pode ser importante para a efetiva eliminação de contaminantes bacterianos, a partir do útero em éguas sensíveis, as concentrações de imunoglobulinas nas secreções uterinas são compatíveis ou mesmo elevadas em comparação com éguas resistentes (ASBURY et al, 1980; KOLM et al, 2006; FUMOSO et al, 2007). A IgA protege os endotélios, epitélios e as cavidades biológicas (ANTUNES, 1992c). As superfícies do qual são depositadas imunoglobulinas M, G e A (IgM, IgG e IgA, respectivamente), proteínas do plasma e estruturas de hidratos de carbono podem após a ligação aos antígenos desencadear a ativação do sistema complemento (REID, 1998). Esta ligação é considerada importante para o controle da propagação e regulação da resposta imune, homeostase e cicatrização de feridas (MÜLLER-EBERHARD, 1988). Portanto as éguas suscetíveis podem ter uma maior resposta imune funcional a estímulos antigênicos (TROEDSSON & LIU, 1991).

2.3 Endometrite

Endometrite é uma inflamação que acomete o útero das éguas (THRELFALL & IMMEGART, 2000), que pode ser dividida em aguda infecciosa, induzida pós-cobertura ou crônica infecciosa (LEBLANC, 2010) sendo responsável por uma das principais causas da diminuição da fertilidade em éguas (CAUSEY, 2006). É a enfermidade reprodutiva mais comum relacionada a espécie e representa grande perda econômica para os criatórios determinando prejuízos decorrentes da queda da fertilidade, morte embrionária, abortos e descarte de animais (ASBURY, 1987). A presença do espermatozóide no útero, após a cobertura ou inseminação artificial, é responsável pelo início de uma reação inflamatória que deve ser considerada como um evento fisiológico,

necessário para a limpeza uterina (KOTILAINEN et al., 1994; FIALA et al., 2007; ENGLAND et al., 2012; FERRER et al., 2012).

As barreiras físicas que impedem o acesso de microorganismos ao útero são a vulva, a prega vestibulo-vaginal e a cérvix (CASLICK, 1937; HINRICHS et al., 1988; LEBLANC et al., 1995). A má conformação interna e externa dos órgãos reprodutivos podem prejudicar estas barreiras e permitir a entrada da bactéria no útero (CASLICK, 1937). Éguas com mais idade normalmente têm menor tônus muscular e maior relaxamento dos ligamentos, fazendo com que o ânus tenha uma posição mais cranial e consequentemente a vulva crie um declive (DASCANIO, 2011). A endometrite persistente pós-cobertura geralmente leva à infertilidade em éguas multíparas com idade superior a 14 anos (LEBLANC, 2003a). Estas éguas mais velhas têm dificuldade de relaxamento da cérvix durante o estro, levando à retenção de sêmen, bactérias e produtos inflamatórios dentro do útero (BRINSKO et al. 2011). Em um estudo realizado por Woodward, et al (2012) comparando a idade com a retenção de fluido uterino após 48 e 96h da inseminação artificial, observaram que as éguas acima de 23 anos tiveram mais retenção de fluido em comparação as éguas com idade inferior. Entretanto Malschitsky et al, (2006) comparando éguas virgens, com idade de 3 a 8 anos, com éguas falhadas, não observaram diferença significativa entre os grupos.

Durante o cio, com o favorecimento dos mecanismos de defesa pelo efeito estrogênico, o processo inflamatório está completamente resolvido em 36-48 horas após a cobertura. As éguas nas quais isso ocorre são classificadas como sadias ou resistentes à endometrite persistente pós-cobertura. Porém, se ocorrer uma falha dos mecanismos de defesa, há condições para que as bactérias possam se aderir à mucosa uterina, levando a uma infecção bacteriana e à persistência da inflamação. A inflamação, por sua vez, favorece também à infecção do tecido endometrial, devido à perda da integridade da barreira mucosa. Nestes casos, a inflamação passa a ser patológica e este quadro é denominado endometrite persistente pós-cobertura (LEBLANC, 2003a). Esta inflamação precisa ser eliminada pela égua em até 96h, devido a chegada do embrião no 5º ou 6º dia após a fertilização (LEBLANC et al., 1994). Em éguas normais, o pico da inflamação ocorre cerca de 10 a 12 horas após inseminação e desaparece sensivelmente dentro de 24 horas (PYCOCK, 2007). Éguas cobertas com endometrite aguda obtiveram uma taxa menor de prenhez comparadas com aquelas cobertas sem evidência de inflamação endometrial (MATTOS et al., 1984). A endometrite persistente pode

interferir diretamente na sobrevivência do embrião, ou causar a luteólise prematura e perda embrionária devido a um aumento da concentração de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (NELLY et al, 1979) com rápido declínio de progesterona e um retorno precoce ao estro (PYCOCK & ALLEN, 1988).

Uma égua saudável, no que se refere ao sistema reprodutor, irá combater a contaminação uterina com uma resposta inflamatória transitória, que inclui a ativação do sistema humoral, recrutamento de células polimorfonucleares para fagocitose de bactérias, liberação de prostaglandinas e aumento da contração uterina. Isto faz com que as éguas que produzam eficazmente esta resposta sejam consideradas resistentes à endometrite. Éguas que não tenham uma resposta eficaz e rápida, são consideradas susceptíveis a endometrite (BRINSKO et al. 2011).

Estudos com o uso de imunomoduladores, corticosteroides, plasma seminal e diluição do sêmen tem sido realizados para diminuir a inflamação durante o tratamento de endometrite (KATILA, 2012). O plasma seminal possui moléculas imunorreguladoras que interagem com o epitélio uterino para induzir alterações na resposta imune (ROBERTSON, 2007). Um estudo recente realizado com IA observou um aumento de citocinas e neutrófilos em 2 h, atingindo um pico entre as 2 e 12 horas em éguas susceptíveis quando comparadas as resistentes. Esses resultados demonstram uma diferença na resposta imune inicial após a inseminação entre os dois grupos (WOODWARD et al., 2013). O curso da reação inflamatória incluindo citocinas pró-inflamatórias, citocinas inibidoras e de regulação, podem ser diferentes em éguas problema (KATILA, 2012).

2.3.1 Fluído uterino

Em muitas éguas, o fluido uterino que se acumula antes da cobertura ou inseminação não apresenta crescimento bacteriano e contém pouca ou nenhuma célula inflamatória. A importância do acúmulo do fluido é que este pode agir como um meio de cultura para bactérias introduzidas no útero (WILLIAN, 2004) e como uma barreira para os espermatozóides contribuindo para baixa fertilidade (WITTE et al., 2012). Um volume de fluido superior a 2 centímetros têm sido associado com a diminuição da prenhez (BRINSKO et al, 2003). Este fluido pode conter neutrófilos, imunoglobulinas (proteína), sêmen, bactérias e outros subprodutos de inflamação. A retenção de fluido prolongada resulta em edema intersticial. A barreira mucociliar do endométrio pode ser

danificada se o líquido persistir no lúmen uterino por um período prolongado (LEBLANC, 2003a).

O acúmulo de fluido pode ser resultante de uma falta de drenagem através do colo do útero ou à diminuição da reabsorção por vasos linfáticos. A drenagem linfática potencialmente pode desempenhar um papel importante na persistência da endometrite (KENNEY, 1978). A localização deste fluido no interior do lúmen uterino, é visualizada através da ultrassonografia no corpo uterino, cornos uterinos, ou na porção cranial do colo do útero e fornecem evidências da causa do seu acúmulo. Éguas com colo do útero que não dilatam adequadamente durante o estro ou fecham muito rapidamente após a ovulação tendem a reter líquidos apenas na porção cranial ao colo do útero. Esta é mais comumente observada em éguas jovens ou éguas velhas nulíparas. As éguas mais velhas pluríparas e suscetíveis a endometrite tendem a acumular fluido nos cornos uterinos e corpo do útero (LEBLANC et al, 1998). Borba et al, (2012) observaram um acúmulo de fluido uterino nas éguas acima de 14 anos comparadas com éguas mais jovens. Portanto estas éguas mais velhas, muitas vezes possuem um colo do útero fechado e não conseguem relaxar corretamente durante o cio, de modo que o útero é incapaz de drenar o fluido acumulando-se no lúmen uterino (PYCOCK, 1993). O acúmulo de líquido pode ser resultado de uma drenagem linfática pobre e contração do miométrio prejudicada pelo colo do útero fechado. A quantidade de líquido intra-uterino pode variar em éguas individualmente, sendo de poucos mililitros a mais que um litro, em casos extremos. A degeneração vascular do endométrio, também pode ser um fator que contribui para o acúmulo de fluido uterino (LEBLANC, 2003b).

2.3.2 Endometrite bacteriana

As infecções bacterianas do trato genital são a principal causa de falha reprodutiva em éguas (WITTENBRINK, 2012) tendo como principal agente o *Streptococcus equi* (RICKETTS, 2011; PROIETTI et al., 2011). Este é um patógeno oportunista encontrado em várias espécies incluindo equinos, suínos, bovinos, caprinos, aves, cães e seres humanos (TIMONEY et al., 1995). É o mais comumente associado com inflamação (FERREIRO et al, 1986; DAVIS et al. 2013) fazendo parte da flora residente no trato reprodutivo da égua (RASMUSSEM et al., 2013). Os estreptococos são cocos gram positivos que se multiplicam em ambientes fluidos como abscessos, leite ou meio de cultura (KOWALSKI, 2000). Portanto o sêmen representa um dos

importantes fatores de risco para a transmissão deste agente (SAMPER & TIBARY, 2006).

A endometrite pode ser causada por *Streptococcus zooepidemicus* oportunistas residentes no trato inferior reprodutivo, levando a uma infecção ascendente ultrapassando os mecanismos de defesa uterino da égua (CAUSEY, 2006; WITTENBRINK et al., 2008). *S. zooepidemicus* para ser capaz de atingir o útero precisa passar por barreiras físicas como a vulva, esfíncter vestibulovaginal e colo do útero. A má conformação interna e externa dos órgãos reprodutivos podem prejudicar estas barreiras e permitir a entrada da bactéria no útero (WILLIAN, 2004). Estudos realizados por Hinrichs et al., (1988) sugerem como possível reservatório bacteriano a fossa do clitóris e indicam que a dobra vulvovaginal, ao invés do colo do útero, pode ser a principal barreira da contaminação bacteriana ascendente do trato reprodutivo.

2.4 Glicocorticoides

As glândulas adrenais, presentes em todos os animais vertebrados, são responsáveis, em sua porção cortical, pela produção dos hormônios esteroides, sintetizados a partir do colesterol. Esses hormônios, também chamados de corticosteroides ou corticoides, podem ser classificados como: mineralocorticoides, glicocorticoides e esteroides sexuais (JERICÒ & De MARCO, 2011). Os glicocorticoides apresentam como funções principais a homeostasia de eletrólitos como o íon de sódio (Na⁺) e de potássio (K⁺), a mediação no metabolismo proteico, de carboidratos e lipídios e, principalmente, uma potente ação anti-inflamatória (HAYNES & MURAD, 1987). Estes podem ser reguladores positivo e negativo de síntese de APP durante a reação da fase aguda (CHU & LEE, 2012). Ao nível molecular, os glicocorticóides formam complexos com os receptores específicos que migram para o núcleo onde eles interagem com sítios regulatórios seletivos dentro do DNA, o que resulta na modulação positiva e negativa de vários genes envolvidos na resposta inflamatória e respostas imunes. Ao nível celular, os glicocorticóides inibem o acesso dos leucócitos locais que interferem com a função dos fibroblastos, e suprimem a produção e os efeitos de fatores humorais envolvidos na resposta inflamatória (BOUMPAS et al., 1993).

Desde a sua descoberta, os esteroides adrenais e seus derivados sintéticos tem sido utilizados em larga escala, tanto pela medicina humana quanto pela veterinária. A

sua enorme utilização se deve aos seus potentes efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores e analgésicos, os quais são acompanhados por efeitos metabólicos gerais, responsáveis pela maioria dos efeitos colaterais observados no uso crônico ou maciço (JERICÒ & De MARCO, 2011). Nos últimos 50 anos os glicocorticóides tem sido utilizados para tratamento de doenças inflamatórias, auto-imune e rejeição de enxertos (BOUMPAS et al., 1993) e continuam sendo os principais agentes imunomoduladores usados na medicina clínica de hoje (GALON., et al 2002).

Os glicocorticoides endógenos são transportados no plasma por proteínas carreadoras, uma globulina de baixas concentrações sanguíneas e alta afinidade pela hidrocortisona e pela albumina, cuja baixa afinidade pelos esteroides endógenos ou sintéticos é compensada pela sua alta concentração plasmática. Devido a lipossolubilidade dos glicocorticóides, estes são capazes de atravessar a membrana celular e se ligar às proteínas receptoras, localizadas no interior do núcleo, modificando a sua expressão gênica. Esses receptores proteicos são encontrados em todos os tecidos (JERICÒ & De MARCO, 2011). Rasmussen et al. (1998) utilizando o tratamento com corticoterapia intra articular teve como resposta um potente efeito analgésico, diminuição do edema nas articulações e uma melhora nas funções musculares, impedindo a resposta inflamatória (proteínas da fase aguda).

Os glicocorticoides suprimem a resposta do tecido conectivo á lesão, seja traumática, anafilática ou infecciosa (McDONALD, 2003). A principal influência dos glicocorticoides no processo inflamatório ocorre através de sua atuação supressora sobre o metabolismo dos mediadores imunoestimulantes e pró-inflamatórios (JERICÒ & De MARCO, 2011). Possuindo atividade de estabilizar os lisossomos no tecido lesado, prevenindo assim que as enzimas proteolíticas dos lisossomos escapem e lesem as células vizinhas. Esta supressão da resposta tissular interfere com a resposta do hospedeiro a uma infecção bacteriana (McDONALD, 2003).

A ação dos glicocorticoides como anti-inflamatórios e imunossupressores pode ser benéfica ou prejudicial à resposta inflamatória. O perfil da expressão gênica de células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis foi isolado por centrifugação e incubado com dexametasona por 18 horas. Os glicocorticóides induziram a expressão das quimiocinas, citocinas, e membros da família do complemento, havendo também a diminuição de IL-1 β , IL-1 α , linfotóxina- β , IFN- β e IFN- α . Estes resultados destacam o importante papel imunossupressor dos

glicocorticóides e de proteção contra a inflamação. Este estudo revela uma panorâmica na regulação gênica onde os glicocorticóides atuam, esta análise representa um painel de um conjunto específico de genes que participam na resposta imune e inflamatória (GALON et al., 2002).

As IL-1 e IL-6 possuem um efeito sinérgico nos linfócitos B na presença de dexametasona, resultando na produção de IgM e IgG (EMILIE, et al., 1988). Os glicocorticóides e IL-4 aumentam acentuadamente a síntese de imunoglobulina E (IgE) (WU et al., 1991). O uso de glicocorticóide (hidrocortisona) em sinergia com a IL-15 induziu um aumento significativo no crescimento de células *Natural Killer* (NK), demonstrando influência positiva no sistema imunitário (PEREZ, et al., 2005). A ação anti-inflamatória dos glicocorticóides também inclui a supressão da resposta febril á infecções ou a lesão tissular. Esta ação ocorre pela produção diminuída de IL-1, que age como um pirogênio endógeno (BERNE, et al., 2004). Os glicocorticóides podem estimular diretamente alguma produção de APP, devido a sua sinergia com as citocinas (THOMPSON et al, 1991).

Os glicocorticóides são capazes de bloquear desde as manifestações mais precoces do processo inflamatório, como calor, rubor e dor, até as mais tardias, como reparação e proliferação tecidual. Os esteroides anti-inflamatórios afetam todos os tipos de resposta inflamatória, seja ela suscitada por patógenos invasores, estímulos físicos e químicos, ou por uma reação imunológica inapropriada, como as hipersensibilidades (JERICÒ & De MARCO, 2011).

2.4.1 Dexametasona

Dexametasona é usada como um agente anti-inflamatório e antialérgico em cavalos (*Equus caballus*) (CORNELISSE et al., 2004). Possui uma estrutura básica com 21 átomos de carbono, e é 20 a 25 vezes mais potente do que o cortisol (LUO et al., 2005a; LOU et al., 2005b) e 5 a 7 vezes mais potente que a prednisona (PLOOG & ROMERO, 2006), sendo um corticóides de ação prolongada acima de 48 horas (PLUMB, 2008) até 72 horas. O pico do efeito é de 1 a 2 horas e a meia-vida de eliminação da dexametasona é de 3 a 6 horas, possuindo excreção renal e biliar (HOEFLER, 2008).

Alteração do perfil proteico (RUZZIN et al., 2005) e do perfil lipídico (BARBERA et al., 2001; HOLNESS et al., 2005) são características comuns após

tratamento com dexametasona. Estudo *in vivo* realizado por Santos et al, (2007) resultou em um aumento da concentração plasmática de proteínas totais e albumina após a administração de Dexametasona em ratos. A dexametasona reduziu a inflamação aguda de lesões em animais tratados apresentando maior inibição do infiltrado de células polimorfonucleares e do edema, em relação aos tratados com meloxicam (MARCHIONNI et al., 2006). Essa efetiva capacidade anti-inflamatória da dexametasona se deve ao fato desse medicamento interferir em fenômenos da inflamação, como na redução do aparecimento da tenascina-C, que é uma proteína presente apenas na matriz extracelular de tecidos lesionados em indivíduos adultos. Essa proteína faz da dexametasona um inibidor do surgimento de leucócitos no local da lesão (FÄSSLER et al, 1996). Esse medicamento tem capacidade de estabilizar as membranas lisossomais dos leucócitos, acarretando menor concentração de enzimas lisossomais e diminuindo a capacidade dos vasos em responder aos estímulos agressivos. Reduz a expressão endotelial das moléculas de adesão intracelular fato que dificulta a migração leucocitária em circulação (PETTET et al, 1995). Além disso, diminui a angiogênese, a síntese de prostaglandinas e leucotrienos por meio do bloqueio da fosfolipase A2, enzima que promove a liberação do ácido araquidônico na lesão celular (LUO et al., 2004). A Dexametasona inibe ainda, a síntese da interleucina-1 α e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que também são quimiotáticos para as células do infiltrado inflamatório crônico (HÜBNER et al., 1996). Na presença de IL-6, a dexametasona é capaz de regular a produção de pré-albumina e de fibrinogênio (THOMPSON et al, 1991). E na presença de endometrite infecciosa induzida em éguas resultou na diminuição do gene na expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e SAA (amilóide sérica A - APP) e um aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (CHRISTOFFERSEN et al., 2012).

2.4.2 Modulação da Resposta Inflamatória

A modulação da resposta imune com esteróides para tratamento de endometrite persistente após cobertura, tem sido proposta nos últimos anos (DELL'AQUA JR. et al., 2006; PAPA et al., 2008; BUCCA et al., 2008; VANDAELI et al 2010; FIORATTI et al 2010; WOLF et al., 2012). A imunomodulação pode ajudar a restaurar os mecanismos inflamatórios locais homeostáticos. Isto pode ser especialmente útil em éguas mais

velhas que possam ter um baixo grau de resposta inflamatória sistêmica associado à idade avançada (ADAMS et al., 2008; ADAMS et al., 2009).

A utilização de Isoflupredona na dose de 0,1mg/Kg a cada 12 horas até a constatação da ovulação, em éguas com histórico de acúmulo de fluido uterino após inseminação, resultou em um aumento nas taxas de prenhez (DELL'AQUA JR. et al., 2006; PAPA et al., 2008). O uso de dose única de dexametasona, 0,1mg/kg, na cobertura demonstrou uma diminuição do acúmulo de líquido após cobertura com uma melhor qualidade (menos turbidez) e redução do edema endometrial (BUCCA et al., 2008). Porém Vandaele et al, (2010), utilizando a dose de 10 e 20mg de dexametasona com aplicação de 6 a 12 horas após inseminação não observaram melhora na taxa de prenhez. Fioretti et al, (2010), não observaram uma diminuição no acúmulo de líquido uterino em éguas tratadas com uma dose única de 40mg de dexametasona administrada duas horas antes da inseminação, sendo as coletas realizadas 8 e 24 horas após a inseminação.

Wolf et al, (2012) utilizando a corticoterapia com a administração de isoflupredona na dose de 20mg a cada 12 horas por três dias consecutivos até a detecção do estro, em éguas suscetíveis infectadas com *Streptococcus Zooepidemicus*, afetou a proteômica do líquido endometrial, sendo os maiores efeitos observados na presença de um processo infeccioso. As coletas foram realizadas 12 horas após o término do tratamento. Neste estudo, verificou-se a frequência e densidade óptica relativa de várias proteínas da fase aguda (APP). A corticoterapia na presença da infecção resultou em um aumento da α_1 -antitripsina (AAT), Transtiretina (TT) e Actina e diminuição da IgG. Durante a infecção intra uterina houve um aumento da haptoglobina (Hp) e Apolipoproteína A-1 (ApoA -1) sendo diminuída a Transferrina (TF). A infecção reduziu os níveis de AAT e TT. A hipótese de que proteínas descobertas por análises proteômicas podem fornecer os perfis de diferenciação necessários para informar a prática clínica e servir como um ponto final para aperfeiçoar tratamentos bem sucedidos (SALAMONSEN et al., 2013) levando a um maior conhecimento do controle durante o processo inflamatório (OVELAND et al., 2012). A corticoterapia influencia a resposta imune, não apenas como supressora, mas também como realçadora de mecanismos de defesa locais, através de uma ação imunomoduladora. A curto prazo, a corticoterapia pode ser benéfica para o tratamento de processos infecciosos do útero em égua (WOLF et al., 2012).

2.5 Proteínas

As proteínas exercem papéis essenciais em todos os processos biológicos. Quase todos catalisadores em sistema biológico são proteínas. As proteínas determinam o padrão de transformações químicas nas células. São também intermediárias de uma ampla faixa de outras funções, como: transporte e armazenamento, movimentos coordenados, sustentação mecânica, proteção imunitária, excitabilidade, integração do metabolismo e controle do crescimento e da diferenciação (STRYER, 1992).

2.5.1 Proteínas da fase aguda (APP)

O sítio de infecção é precocemente o palco de uma série de reações conhecidas como reações de fase aguda, que visam restringir a propagação do agente infeccioso, facilitar o acesso das células responsáveis pela resposta inflamatória e pela imunidade específica e finalmente desencadear reações sistêmicas que resultam na aceleração geral do metabolismo, facilitando a eliminação do agente agressor (SILVA, 1992).

A resposta da fase aguda é a resposta do organismo a perturbações na sua homeostase causadas pelas lesões de tecidos, infecção, traumatismo, doenças imunológicas ou estresse. Esta resposta pertence a mecanismos de defesa não específicos e é mediada pelas citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6, IL-1 e TNF- α , que atuam como uma consequência. A reação sistêmica é induzida, que inclui febre, anorexia, alterações metabólicas e hormonais, bem como alterações nas concentrações das APPs. O comportamento das APPs pode diferir entre as espécies e a sua concentração de exposição, aumentos ou diminuições, durante a resposta da fase aguda (BAUMANN & GAULDIE, 1994; GABAY & KUSHNER, 1999). As determinações das APPs são ferramentas úteis para monitorar a gravidade de respostas inflamatórias em animais e seres humanos expostos a fatores nocivos (DABROWSKI et al., 2007; PIÑEIRO et al., 2009; WOODS & PADMANABHAN, 2013). O uso destas em medicina veterinária é cada vez mais difundido com a utilização de kits diagnósticos comerciais que estão sendo validados (CRISMAN et al., 2008). Há setenta e cinco anos atrás, a proteína C-reativa foi a primeira APP reconhecida nos seres humanos e tornou-se posteriormente uma ferramenta para o sistema de diagnóstico de valor inestimável na medicina humana para detectar e monitorar a inflamação (PEPYS, 1981).

As APPs são classificadas como proteínas positivas, divididas em maiores e moderadas, e em proteínas negativas. Esta classificação depende das suas concentrações

plasmáticas. A APP negativa na maioria das espécies é a albumina sendo o componente mais abundante no plasma (ALLEN & KOLD, 1988). Durante a resposta aguda, a síntese de albumina diminui em favor do aumento da síntese hepática de APPs positivas. As principais APP positivas têm as seguintes características: a- concentrações baixas ou indetectáveis no plasma de indivíduos saudáveis; b- as concentrações aumentam rapidamente a níveis superiores a 10 vezes durante a resposta aguda; c- expressar uma ampla variação dinâmica; d- rápida diminuição da concentração com a resolução da doença; e- aumento das concentrações nas infecções secundárias. Atualmente, apenas Amilóide Sérica A (SAA) preenche os critérios de uma APP positiva importante em cavalos. As APPs positivas moderadas, tem as seguintes características: a- sempre presentes no plasma de equinos saudáveis; b- as concentrações aumentam de 1 a 10 vezes na resposta a inflamação ou ferimento; c- a resposta é geralmente mais lenta (dias a semanas) para aumentar até o pico e retornar à linha basal. Exemplos de APPs moderadas em cavalos incluem Hp, Fb, α 1-glicoproteína ácida (AGP) e proteína C reativa (CRISMAN et al., 2008). As APPs negativas são aquelas cujo os níveis são diminuídos com a produção da resposta aguda (HEINRICH et al. 1990). Dentro deste grupo encontram-se as proteínas: pré- albumina, albumina e a transferrina (MARTÍNEZ-SUBIELA et al 2001).

As proteínas de fase aguda (APP) fazem parte de uma família com cerca de 30 proteínas plasmáticas produzidas em maiores quantidades no fígado durante a inflamação (STEEL & WHITEHEAD, 1994). O pico de produção das proteínas de fase aguda geralmente ocorre entre 12 e 24 horas após o início da resposta inflamatória aguda (BILATE, 2007). Suas funções incluem: limitar a inflamação regulando a resposta imune, mediar as proteases inibidoras e de eliminação de radicais livres (BANKS et al., 1995; SILVA, 1992). APPs são definidas como proteínas do plasma cuja concentração aumenta ou diminui em pelo menos 25% após um estímulo inflamatório (GABAY & KUSHNER, 1999). Em geral, um aumento substancial nas concentrações plasmáticas de APP em cavalos tem sido demonstrada com as infecções bacterianas (COHEN et al, 2005) e virais (HULTÈN et al, 1999), cirurgia (POLLOCK et al., 2005), cólica (VANDENPLAS et al., 2005) e artrite induzida experimentalmente (JACOBSEN et al., 2006; HULTÉN et al., 2002). A taxa e a magnitude da mudança na concentração do plasma refletem na sua indução por diferentes citocinas, seu tamanho molecular, o volume de distribuição, e a taxa de catabolismo tanto na circulação quanto

no local da inflamação (BANKS et al., 1995). Estudos *in vitro* utilizando culturas de hepatócitos, e a partir de correlações de soro de IL-6 com concentrações dos níveis de APP em vários estados inflamatórios *in vivo*, concluíram que a IL -6 é o regulador principal para a maioria dos genes APP (BAUMANN & GAULDIE, 1994). Uma característica-chave de inflamação no útero é o excesso de produção de proteínas de fase aguda (SHELDON et al., 2001). A regulação das APPs no útero pode ser importante para a resolução bem sucedida da inflamação podendo levar a posterior prenhez (HERATH et al, 2006). As APPs junto com as citocinas e quimiocinas são utilizadas como indicadores para problemas de fertilidade associados à infecção uterina. Estes indicadores podem conter pistas sobre a resposta imune uterina e resolução da inflamação (CHAPWANYA et al., 2009). As determinações das APPs são cada vez mais comuns no acompanhamento do período pós-operatório, utilizadas como marcador da gravidade dos processos inflamatórios e para permitir a detecção precoce de complicações em doentes submetidos a cirurgia (NIEDZIELA et al., 2001). As APPs mais frequentemente medidas na prática equina são fibrinogênio, SAA e haptoglobina (Hp) (HULTÉN et al., 2002).

Entre os inúmeros papéis atribuídos às APPs estão: a ativação do complemento, coagulação, fibrinólise e a inibição de proteases dos neutrófilos. As combinações de citocinas em diversas células alvo podem ter um efeito estimulador ou supressor. Além disso, os glicocorticóides estimulam os efeitos das citocinas sobre a produção de APPs, ao passo que a insulina pode jogar um papel inibitório sobre a produção de algumas APPs (GABAY & KUSHNER, 1999). Sendo que algumas APPs ativam os microrganismos e outras limpam os restos celulares e os radicais livres, neutralizando enzimas proteolíticas (GRUYS et al., 2006).

2.5.1.1 Albumina

A albumina (Alb) é uma das principais proteínas presentes no plasma. É uma proteína formada no fígado, cuja taxa de formação pode ser extremamente alta, da ordem de 30g/dia. E tem como principal função produzir pressão coloidosmótica no plasma, o que impede a perda de plasma pelos capilares (GUYTON & HALL, 2006). É responsável pelo transporte e distribuição do metabolismo e excreção de drogas (JIANG et al., 2012). Algumas drogas anti-inflamatórias possuem maior afinidade à albumina como o carprofeno (RAHMAN et al., 1993). A albumina é separada no plasma

tradicionalmente por sua solubilidade, podendo ainda, ser separada pela migração em um campo elétrico por um processo chamado de eletroforese (ABBAS et al., 2008).

A albumina possui peso molecular de aproximadamente 66,5 kDa é um polipeptídeo de cadeia única de 585 aminoácidos, com uma estrutura tripla que se reúne para formar uma molécula em forma de coração (WENYING et al., 2005). É uma APP negativa, onde os níveis são diminuídos com a produção da resposta aguda (MARTÍNEZ-SUBIELA et al 2001). Porém, Shamay et al (2005), verificou um aumento da albumina sintetizada pelas glândulas mamárias de vacas com mastite em comparação com vacas sadias, sugerindo que a albumina faz parte do sistema imune inato das glândulas mamárias.

Em éguas com metrite crônica, as concentrações de albumina foram significativamente elevadas nas secreções uterinas (WIDDERS et al., 1984). Em um estudo realizado por Tunón et al (1998) com éguas sadias por meio de coleta com tampão intra-uterino num período de 30 minutos, a concentração de albumina no líquido uterino foi 56% mais elevada do que a concentração encontrada no soro. Em mulheres com um dispositivo intra-uterino, a concentração de albumina no fluido uterino durante os períodos pré-ovulatórios e pós-ovulatórios foi oito vezes menor do que no soro (TAUBER et al., 1993).

A albumina compõe o índice prognóstico inflamatório e nutricional (IPIN) que é utilizado na medicina humana, na prática clínica como parte do diagnóstico, tanto na avaliação da intensidade e da atividade inflamatória, como na discriminação de doenças inflamatórias das não inflamatórias (INGENBLEEK & CARPENTIER, 1985; VAN LEEUWEN & VAN RIJSWIJK, 1994). A albumina pode ser utilizada como um marcador para graus de risco de complicações do estresse inflamatório (CORRÊA et al., 2002) e como marcador prognóstico de enfermidades (FOX et al., 2013). A albumina teve queda na sua concentração quando usada em cobaia com diferentes doses de dexametasona (ULUTAS et al., 2007).

Mesmo sintetizada no fígado, a expressão não hepática da albumina tem sido documentada em diversos outros tecidos, incluindo: a retina de camundongos (DODSON et al. de 2001), músculo esquelético de humanos (VISSER et al., 2005), miocárdio de humanos (DUMAN et al., 2013), células epiteliais ovarianas humana (VARRICCHIO & STROMBERG, 1994) e as células serosas das glândulas traqueais bovina (JACQUOT et al. , 1988).

2.5.1.2 Actina

A actina é uma proteína presente em todos os eucariontes, é o constituinte principal dos filamentos finos do citoesqueleto celular que se ligam a miosina. Em soluções de baixa força iônica, a actina é um monômero de 42 kDa chamado de actina G devido a sua forma globular. Quando a força iônica é aumentada para o nível fisiológico a actina G polimeriza-se para uma forma fibrosa chamada de actina F (STRYER, 1992). A dinâmica de filamentos de actina é vital para a plasticidade celular, a função mitocondrial, e a expressão do gene, apesar de ser altamente susceptível ao dano oxidativo (BARTH et al., 2009). A actina interage com diversas proteínas (KABSCH et al., 1985). Os filamentos de actina do citoesqueleto e funções musculares são regulados por proteínas de ligação à actina, utilizando uma variedade de mecanismos. O regulador de filamentos de actina universal é a proteína tropomiosina (BARUA et al., 2013), que está envolvida em diversas funções celulares, como: contração muscular, citocinese, transporte intracelular e migração das células (WANG & COLUCCIO, 2010).

A actina é uma das proteínas mais antigas em evolução eucariótica (VANDEKERCKHOVE & WEBER, 1984). Esta extrema conservação da estrutura da actina basicamente reflete duas características importantes da molécula: a capacidade de se auto-organizar em polímeros de actina F e actina G, e a propriedade de interagir com uma multiplicidade de proteínas que se ligam à actina regulando-a (KABSCH et al., 1990).

O sistema de filamentos de actina, não só está envolvido na motilidade celular, como também na regulação de outras funções dos neutrófilos (BENGTSSON et al., 1991). Considera-se que a força motriz para motilidade dos neutrófilos, como a quimiotaxia e fagocitose, é gerada por alterações dinâmicas do sistema de microfilamentos periférico. Isto se reflete no fato de que diferentes estímulos quimiotáticos e fagocíticos induzem extensas e reversíveis polimerizações dos filamentos de actina, especialmente nas áreas da célula exibindo intensa atividade motora (WALLACE et al., 1984). O rápido alinhamento e desalinhamento da actina são de extrema importância para a adesão e extravasamento de neutrófilos para locais inflamados. O movimento dos neutrófilos ocorre com base na capacidade única da actina de mudar rapidamente entre actina G (filamentosa) e actina F (polimerizada) (WALLACE et al., 1987). Durante a quimiotaxia o aumento do número de filamentos

de actina concentra-se predominantemente na extremidade do neutrófilo (CUENDA et al., 1995). Em consequência do rápido alinhamento da actina os neutrófilos são capazes de orientar a sua migração e expor seu movimento quimiotático que facilita seu acúmulo nos locais da lesão ou infecção (ZIGMOND, 1977). A actina é utilizada como um marcador em doenças inflamatórias (KWON et al., 2003; WOLF et al., 2012). Em um estudo realizado por Yates-Siilata et al, (2004), com o objetivo de desenvolver agentes terapêuticos contra doenças inflamatórias associadas a neutrófilos, demonstraram que a proteína C reativa produziu um aumento simultâneo da actina F e diminuição dos níveis da actina G. Kim et al, (2010), sugerem que a remodelação da actina pode ser um evento-chave durante a regulação da resposta inflamatória, através da produção de óxido nítrico e liberação de PGE_2 e $TNF\alpha$.

Embora as funções da actina nos macrófagos durante a resposta inflamatória não são bem conhecidas, sabe-se que a actina modula a migração e a adesão de macrófagos e monócitos (PERRI et al., 2007). O realinhamento da actina é claramente visível durante a infecção microbiana com presença de macrófagos (SHIMADA et al., 1999).

2.5.1.3 Apolipoproteína A-1

Apolipoproteína A-1 (ApoA-1) é um polipeptídeo de cadeia única com 243 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 28 kDa (WEISGRABER et al., 1980). A ApoA-1 é uma APP negativa sendo a principal lipoproteína componente do colesterol de alta densidade, o HDL, possuindo a função de remover o colesterol de macrófagos na parede arterial. O HDL é um antioxidante que possui propriedades anti-inflamatórias (KERRY-ANE, 2013). A ApoA-1 sobre a superfície do HDL, com sua estrutura flexível serve como ligação para interações funcionais do metabolismo direto do HDL (GURSKY et al., 2013). A ApoA-1 é utilizada como um marcador para variáveis clínicas (NYMO et al., 2011) e como um indicador de lesões (KAMEDA et al., 2012), reduzindo os seus valores após a infecção (GRUNFELD et al., 1992). Uma fração da ApoA-1 pode ser oxidada por uma enzima chamada de mieloperoxidase (MPO), que é derivada a partir de macrófagos e neutrófilos (DAUGHERTY et al., 1994), sendo utilizada como um biomarcador em doenças infecciosas e processos inflamatórios (BIASUCCI et al., 1996). Em estudo realizado por Hyca et al, (2001), foi demonstrado que a ApoA-1 inibe a ativação de monócitos estimulados por células T e a produção de IL-1b e $TNF\alpha$. Sugere-se que a ApoA-1 pode inibir a produção local de

citocinas pró-inflamatórias por monócitos e macrófagos em contato direto com as células T estimuladas (BRESNIHAN et al., 2004).

As variações da concentração da ApoA-1 foram observadas em várias doenças inflamatórias. Em artrite reumatoide, os níveis circulantes de ApoA-1 em pacientes não tratados foram mais baixos do que em indivíduos normais (PARK et al., 1999). Em contraste, um estudo realizado por Ananth et al, (1993) com a mesma enfermidade, os níveis de ApoA-1 foram aumentados no fluido sinovial dos pacientes, influenciando na resposta imune da enfermidade. Foi demonstrado altas quantidades de ApoA-1 no fluido sinovial dos pacientes com artrite (BRESNIHAN et al., 2004). Em estudo realizado por Wolf et al, (2012), foi observado um aumento da ApoA-1 no fluido uterino de éguas com infecção por *Streptococcus equi*.

2.5.1.4 Transtiretina

A transtiretina (TTR), anteriormente chamada de pré-albumina (ANDO, 2009), é uma proteína globular, não glicosada com peso molecular de 54,98 kDa (INGBAR, 1958). É uma APP negativa que tende a diminuir suas concentrações séricas diante de um processo inflamatório. Isto ocorre devido à inibição da sua síntese pelas citocinas pró-inflamatórias (CALAMITA & BURINI, 1993) e ao aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente saída para os espaços extravasculares (CORRÊA & BURINI, 2000). A TTR liga-se a molécula de ligação ao retinol (RBP) que possui um peso molecular de 14 kDa, formando o complexo TT-RBP, ficando com uma massa total de aproximadamente 76 kDa (JHONSON et al., 2008).

A transtiretina, tem como função o transporte dos hormônios tireoidianos (T3 e T4) e fixação de retinol. Sua meia vida plasmática é de dois a três dias e sua concentração é influenciada por alterações nutricionais e fatores ligados á resposta aguda do organismo frente a lesões teciduais (JOHNSON, 2007).

A TTR é a proteína mais conveniente para a avaliação de terapias nutricionais, porém as alterações em sua concentração não são exclusivas das modificações do status nutricional, sendo também influenciada por doenças hepáticas e processos inflamatórios. A melhoria no status nutricional com PCR dentro da normalidade vem acompanhado de elevação da TTR (CYNOBER, 2009).

O aumento das concentrações de TTR são influenciadas por diversos fatores: uso de corticoterapia, falha renal crônica e desidratação aguda (JHONSON et al., 2008). A

corticoterapia aplicada em éguas na presença de infecção resultou no aumento da transtiretina (WOLF et al., 2012).

2.6 Eletroforese bi-dimensional

Uma molécula com carga elétrica líquida move-se em um campo elétrico. Esse fenômeno denominado eletroforese, oferece um meio poderoso de separação de proteínas e outras macromoléculas, como DNA e RNA (STRYER, 1992).

A eletroforese em gel de poliacrilamida tem sido extremamente proveitosa como uma ferramenta analítica para a separação e quantificação de espécies de proteínas de complexas misturas (GALDOS-RIVEROS et al., 2010).

Esta técnica foi demonstrada pela primeira vez em 1975 (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). Em géis bidimensionais, os polipeptídios aparecem formando manchas (spots) após serem corados. Diferentes manchas podem conter isoformas da mesma proteína com coordenadas específicas de ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM). Em 1988, foi introduzido o uso de gradientes imobilizados de pH (IPG), nos quais tampões são copolimerizados com acrilamida e bisacrilamida, acarretando uma melhor reprodutibilidade dos perfis bidimensionais (GÖRG et al., 1988).

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é uma técnica que pode ser usada para a obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra como também para estudos comparativos entre amostras. O aparecimento ou desaparecimento de manchas ou spots pode fornecer informações acerca de proteínas específicas de um estágio determinado, enquanto a intensidade das manchas fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial dos polipeptídios (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Em comparação com a eletroforese unidimensional em géis desnaturantes de poliacrilamida, conhecida como SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio), a eletroforese 2D-PAGE apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas enquanto que na SDS-PAGE as bandas proteicas tendem a se sobrepor, os métodos unidimensionais de separação, podem separar um número relativamente pequeno de proteínas, geralmente menos de 50 (GALDOS, 2009). A eletroforese bidimensional, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas num único gel (ANDERSON & ANDERSON, 1996). Esta técnica tem sido usada na reprodução, tanto em machos como em fêmeas, com a identificação de proteínas que podem ser usadas como

marcadores de fertilidade (JOBIN et al., 2005; MOURA et al., 2007; MALSCHITZKY et al., 2008; WOLF et al., 2012).

De acordo com Chromy et al. (2004) e Qualtieri et al. (2007) na eletroforese 2D-PAGE, as proteínas são separadas com base em duas de suas propriedades: em uma primeira dimensão, de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e em uma segunda dimensão, em gel de SDS-PAGE de acordo com o seu peso molecular (MW). A eletroforese 2D resulta da combinação de duas técnicas: a focagem isoelétrica (IEF), seguida por uma separação de SDS-PAGE. Quando bem sucedida tem-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos spots, cada um correspondendo a uma proteína ou a uma forma proteica (SANTOS et al., 2004).

2.7 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massa tem se tornado uma ferramenta importante na análise de peptídeos e proteínas, na última década, devido a sua alta capacidade de processamento das amostras, por ser bastante sensível e ter uma elevada acurácia para a produção dos resultados esperados (CAREY et al., 2002). É uma técnica que permite avaliar a massa molecular dos compostos e quantificá-los, identificar compostos desconhecidos, revelar a estrutura de moléculas e determinar as modificações pós-traducionais, ou seja, aplicadas à análise de biomoléculas ela fornece uma informação precisa da massa molecular, identifica proteínas usando a massa molecular de peptídeos tripticos, informação estrutural, sequenciamento de peptídeos e identifica modificações pós-traducionais (JUNIOR et al., 2013).

Esta técnica mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa (GROSS, 2004). De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas os íons formados são separados de acordo com suas relações m/z e posteriormente detectados, usualmente por elétron multiplicador (FENN et al., 1989; GROSS, 2004). Até a década de 80, a necessidade de ionizar as moléculas para obter um espectro de massas era um grande obstáculo no caso de moléculas biológicas de alta massa molecular. Nos métodos de ionização disponíveis na época, as moléculas a serem ionizadas deveriam estar em fase gasosa, sob alto vácuo e a altas temperaturas, condições incompatíveis com biomoléculas. Esse problema foi

resolvido com o surgimento de duas técnicas brandas para ionizar moléculas biológicas grandes, que são: a espectrometria de massas com base na desorção e ionização das proteínas de laser, auxiliado por uma matriz (MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), que analisa a massa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise (ToF - Time of Flying); e a espectrometria de massas baseada na ionização por pulsos elétricos em médio líquido (ESI – ElectroSpray Ionization); (FENN et al., 1989; ROCHA et al., 2005).

Com o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais especializados para proteínas, a espectrometria de massas tornou-se ferramenta revolucionária na química de proteínas moderna (GALDOS-RIVEROS et al., 2010). A espectrometria de massas vem permitindo a identificação de proteínas por uma metodologia denominada "*peptide mass fingerprinting*". Esta metodologia é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica produzindo fragmentos denominados peptídeos (ROCHA et al. 2005). As massas desses peptídeos são então determinadas com grande acuidade (0,1 a 0,5 Da) por espectrometria de massas. As massas obtidas formam uma espécie de impressão digital, "*fingerprinting*", da proteína. Softwares especiais permitem comparar o "*peptide mass fingerprinting*" da proteína que queremos identificar com os gerados, teoricamente para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados. Se a sequência da proteína problema estiver no banco de dados ela será imediatamente identificada (DE SOUSA et al., 2003).

3. ARTIGO

EFEITO DA DEXAMETASONA NA PROTEÔMICA DO FLUIDO ENDOMETRIAL DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS A ENDOMETRITE

T.R. Arlas¹, C.A. Wolf^{1,*}, B.P.L. Petrucci¹, J. F. Estanislau², R.M. Gregory, M. I. M. Jobim, R.C. Mattos¹

¹REPROLAB, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

²UNIPROTE-MS, UFRGS, RS, Brazil

Resumo

A corticoterapia tem sido utilizada frequentemente nas éguas suscetíveis. O uso de isoflupredona melhora a taxa de prenhez e altera o perfil proteico do líquido endometrial em relação a éguas não tratadas. A utilização de dexametasona diminui o acúmulo de líquido pós-cobertura, reduz o edema do útero, porém, desconhecem-se seus efeitos no perfil proteico do líquido endometrial. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da dexametasona em éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura sobre perfil proteico do líquido endometrial na presença ou ausência de infecção. Nove éguas suscetíveis foram utilizados, com idade entre 7 a 30 anos. Após a verificação dos sinais de estro as éguas foram submetidas a quatro tratamentos: (C) éguas não receberam nenhum tipo de tratamento e serviram como controle; (D) éguas receberam 40mg de dexametasona (IV), no momento da cobertura, com coleta da amostras após 6 horas, (I-6 e I-24) infusão intra-uterina de 1×10^9 de *S. zooepidemicus*/mL, com coleta da amostra após 6 e 24 horas; (I/D-6 e I/D-24) infusão intra-uterina de 1×10^9 *S. zooepidemicus*/mL e administração de 40mg de dexametasona (IV), com coleta da amostra após 6 e 24 horas. Todas as éguas foram submetidas a todos os tratamentos. As amostras foram coletadas e submetidas à eletroforese bi-dimensional para separação proteica e espectrometria de massa para a identificação das bandas proteicas relevantes. A corticoterapia provocou alteração na proteômica do líquido endometrial de éguas suscetíveis, caracterizada pelo aumento (TTR) e/ou diminuição (ApoA1) na densidade óptica de proteínas da fase aguda da inflamação. Conclui-se que a utilização da dexametasona em éguas com e sem presença de infecção altera a proteômica do fluido endometrial de éguas suscetíveis. Sugere-se que a dosagem ou a frequência de aplicação da dexametasona deva ser aumentada.

Palavras-chave: equinos, glicocorticoides, transtiretina, albumina, actina, apolipoproteina A1.

EFFECT OF DEXAMETHASONE ON PROTEOMICS OF ENDOMETRIAL FLUID FROM MARES SUSCEPTIBLE TO ENDOMETRITIS

T.R. Arlas¹, C.A. Wolf^{1*}, B.P.L. Petrucci¹, J. F. Estanislau², R.M. Gregory, M. I. M. Jobim, R.C. Mattos¹

¹REPROLAB, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

²UNIPROTE-MS, UFRGS, RS, Brazil

ABSTRACT

Corticotherapy has often been used in susceptible mares. The use of isoflupredona improves pregnancy rate and alters the protein profile of the endometrial fluid in relation to untreated mares. The use of dexamethasone decreases the post breeding fluid accumulation, reduces the uterine edema, however is unaware of its effects on the protein profile of endometrial fluid. The aim of the present study was analyze the effect of dexamethasone in mares susceptible to post-breeding persistent endometritis on the protein profile of endometrial fluid in the presence or absence of infection. Nine susceptible mares were used, aged 7-30 years old. After checking the signs of estrus, mares were subjected to four treatments: (C) mares received no treatment and served as controls; (D) mares received 40 mg of dexamethasone at breeding time, with collection of samples after 6 hours; (I-6 and I-24) intrauterine infusion of 1×10^9 *S. zooepidemicus*/ml and the sample was collected after 6 and 24 hours; (I/D-6 and I/D-24) intrauterine infusion of 1×10^9 *S. zooepidemicus*/ml and 40 mg of dexamethasone administration, collecting the sample after 6 and 24 hours. All of the mares were subjected to all treatments. Samples were collected and subjected to two-dimensional electrophoresis for protein separation and mass spectrometry for the identification of relevant protein bands. Corticotherapy resulted in alteration of the protein profile of the endometrial fluid of susceptible mares, characterized by an increase (TTR) and/or decrease (ApoA1) in optical density of the acute phase of proteins of inflammation. We conclude that the use of dexamethasone in mares with and without the presence of infection alters the protein profile of endometrial fluid of susceptible mares. It is suggested that the dosage or frequency of application of dexamethasone should be increased.

Keywords: horses, glucocorticoids, transthyretin, albumin, actin, apolipoprotein A1.

Introdução

A endometrite é uma inflamação fisiológica e transitória que serve para limpeza do excesso de espermatozoides mortos e outros contaminantes uterinos formados pela deposição do sêmen (TROEDSSON, 1999). É a enfermidade reprodutiva mais comum relacionada a espécie, representando grande perda econômica para os criatórios de todo mundo (ASBURY, 1987), sendo responsável por uma redução substancial na fertilidade das éguas com taxa de morte embrionária três vezes maior que nas éguas sadias (MALSCHITZKY et al., 2003). O espermatozoide é considerado o principal causador da inflamação que ocorre sempre após a cobertura ou inseminação (KOTILAINEN et al., 1994; FIALA et al., 2007). As éguas que resolvem completamente o processo inflamatório em 36-48 horas após a cobertura, são classificadas como sadias ou resistentes à endometrite persistente pós-cobertura (KATILA, 1996). Porém, se ocorrer uma falha dos mecanismos de defesa levando à persistência da inflamação e a uma infecção bacteriana, este quadro é denominado endometrite persistente pós-cobertura (LEBLANC, 2003a).

A modulação da resposta inflamatória com o uso de glicocorticoides tem sido proposta como eficaz para o tratamento da endometrite persistente pós cobertura, observando-se aumento nas taxas de prenhez (DELL'ACQUA Jr et al., 2006; PAPA et al., 2008) com o uso de isoflupredona. Porém o uso da dexametasona não afetou a taxa de prenhez das éguas tratadas quando comparadas ao grupo controle (VANDAELE et al., 2010). A aplicação de dose única de dexametasona, no momento da cobertura, diminuiu o acúmulo de líquido endometrial com redução do edema e da turbidez (BUCCA et al., 2008). Entretanto, após a administração de dose única da dexametasona, duas horas antes da inseminação, não se observaram diferenças no volume de fluido uterino recuperado após 8 e 24 horas (FIORATTI et al, 2010).

A administração de isoflupredona em éguas suscetíveis infectadas com *Streptococcus Zooepidemicus* alterou o perfil proteico do líquido endometrial, com maiores efeitos quando aplicado na presença de um processo inflamatório. Verificou-se uma modulação do processo inflamatório através da diminuição de IgG e por efeitos estimuladores, como o aumento de α 1-atitripsina, transtiretina e actina, potencializando o mecanismo de defesa e de proteção do tecido inflamado (WOLF et al., 2012).

Entretanto, desconhecem-se os efeitos da dexametasona no perfil proteico do líquido endometrial de éguas suscetíveis.

O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da dexametasona em éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura sobre o perfil proteico do líquido endometrial na presença ou ausência de infecção.

Material e Métodos

Local de execução

Este experimento foi realizado no laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) que se localiza na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (30 04' S, 51 07' W).

Animais

Foram utilizadas amostras de 9 éguas suscetíveis à endometrite, selecionadas de um rebanho experimental, com idade entre 7 e 30 anos em fase cíclica e clinicamente sadias. A classificação quanto à suscetibilidade foi realizada de acordo com Malschitzky et al. (2008). Para a classificação, as éguas foram inseminadas artificialmente com 500×10^6 de espermatozoides diluídos em leite desnatado, obtendo um volume final de 20 mL. As éguas foram submetidas a um exame ultrassonográfico 36 a 48 horas após a inseminação artificial e as que apresentaram líquido intrauterino superior a 15mm foram classificadas como suscetíveis. As éguas foram mantidas livres em piquetes com água a vontade e arraçadas com aveia duas vezes ao dia mais feno.

Manejo reprodutivo

As éguas foram sincronizadas com 5 mg de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Lutalyse[®], Pfizer Saúde Animal, Paulínia, Brasil), com intervalo de 14 dias e a atividade reprodutiva foi avaliada através de palpação retal e ultrassonografia transretal. Após observado folículo dominante (≥ 35 mm) e edema uterino evidente, as éguas foram submetidas aos tratamentos abaixo:

Controle (C)

As éguas não receberam nenhum tipo de tratamento e serviram de controle.

Dexametasona (D)

Aplicação endovenosa de 40 mg de Dexametasona (Cortivet[®], UCB, Jaboticabal, Brasil) no momento da detecção do folículo dominante, com coleta da amostra após 6 horas da aplicação.

Infecção Experimental (I)

Infusão de 1×10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* /mL suspensas em 20 mL de solução salina a 0,9% realizada assepticamente no dia da detecção do estro, com o uso de uma pipeta de inseminação (MATTOS et al., 1997). As coletas foram realizadas 6 e 24 horas após infusão uterina, formando os grupo I-6 e I-24 respectivamente.

Os *Streptococcus zooepidemicus* foram isolados a partir de uma égua com sinais clínicos de endometrite. Após o isolamento, as bactérias foram cultivadas em infusão de cérebro e coração (BHI) durante 24 horas. Glicerina foi adicionada às bactérias em BHI e colocadas em frascos de 2,0mL (Eppendorf do Brasil[®], São Paulo, SP, Brasil), armazenados em freezer a -20°C. Antes da infusão, as bactérias foram descongeladas em banho-maria a 37°C, cultivadas em meio BHI durante 24 horas, semeadas em placas de 100 mm de agar sangue e incubadas a 37°C durante 24 horas, permitindo o crescimento bacteriano. As placas foram lavadas com PBS e as colônias bacterianas foram cuidadosamente removidas. A suspensão bacteriana resultante foi então filtrada para remover as partículas de agar e ressuspendidas em PBS a uma concentração final de 1×10^9 UFC/mL. A suspensão foi colocada em frascos de 20 ml e mantida a 5°C até à sua utilização.

Infecção Experimental + Corticoterapia (I/D)

A corticoterapia e a infusão de *Streptococcus zooepidemicus* foram realizadas como descrito acima, com as coletas feitas 6 e 24 horas após infusão uterina, formando os grupos I/D-6 e I/D-24 respectivamente.

Desenho Experimental

Todas as éguas foram submetidas aos quatro tratamentos com intervalo de um ciclo estral entre eles. Como foi adicionado um novo elemento a cada novo tratamento a ordem dos tratamentos foi similar a descrita por Wolf et al, (2012), para assegurar que o

novo elemento não afetasse o próximo tratamento. O primeiro estro utilizado foi o do grupo controle (C), o terceiro estro do grupo Dexametasona (D), o quinto estro do grupo infecção experimental com coleta após 6 e 24 horas (I-6 e I-24), o sétimo estro do grupo corticoterapia + infecção experimental com coleta após 6 e 24 horas (I/D-6 e I/D-24). Para as manipulações transvaginais, a cauda das éguas foi enfaixada e a região perineal lavada com água, sabão neutro e degermante (Laboriodine[®], 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

As amostras do líquido endometrial foram coletadas através do uso de tampões vaginais comerciais (Mini OB[®], Johnson & Johnson Industrial Ltda, São José dos Campos, Brasil). Os tampões foram introduzidos no útero, de acordo com o método de Reilas (2001), modificado por Malschitzky et al. (2008). Com a mão enluvada, o tampão foi introduzido pela cérvix protegida por luva de palpação. A parte distal de uma luva de palpação foi cortada para formar um tubo plástico. A mão enluvada com o tampão foi introduzida no tubo plástico fechando sua extremidade com os dedos, protegendo o tampão. No momento da introdução do tampão no útero, o tubo plástico foi removido. O tampão permaneceu no útero por 30 minutos sendo removido, protegido por luva de palpação e inserido em saco plástico estéril. O saco plástico contendo o tampão foi introduzido num tubo cônico estéril e centrifugado por 10 minutos a 1.500 x g para remover o líquido do interior do tampão. O líquido foi retirado e colocado em tubo cônico estéril e centrifugado por 1 hora a 1000 x g, na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi dividido em amostras de 2 mL e transferido para criotubos e estocados a -80°C, até o momento do uso.

Eletroforese bi-dimensional

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente. A quantidade de proteína foi determinada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão 1mg/mL de albumina sérica bovina. A eletroforese bi-dimensional foi realizada de acordo com o método de Görg et al. (1987) modificado por Van Tilburg et al. (2013) em duplicata.

Reidratação das tiras

As tiras de 7cm (IPG Strips pH 3 – 10 linear, GE LifeSciences®, Piscataway, NJ, USA) foram retiradas do freezer e descongeladas. A bandeja de reidratação foi devidamente nivelada e adicionada, em suas canaletas, a solução de reidratação (7 M ureia, 2 M tiourea, 2% anfólitos livres [IPG buffer, pH 3-10 (GE LifeSciences®)], 2% DTT, 2% CHAPS e traços de azul de bromofenol) acrescida de 200µg de proteína. As tiras foram retiradas da embalagem e com a ajuda de uma pinça, foi removido o plástico que protege o gel. A tira foi colocada sobre a solução com o gel para baixo, cuidando para não deixar bolhas entre o gel e a solução. Óleo mineral foi adicionado, cobrindo a fita e preenchendo toda a canaleta. O processo de reidratação foi realizado durante 16 horas à temperatura ambiente.

Primeira dimensão

A focalização isoeletrica foi realizada em um Protean IEF Cell® (BIO-RAD). As tiras foram colocadas no aparelho, assegurando que a direção dos polos da tira e do aparelho estivessem na direção correta. Foram recortados pedacinhos de aproximadamente 2 cm de Electrode Strip® (papel de filtro GE 18-1004-40), que servem de ponte entre o eletrodo e a tira. Estes foram umedecidos em água destilada e acondicionados nas duas extremidades de cada tira. Óleo mineral foi adicionado sobre as tiras, cobrindo todas as canaletas. A focalização isoeletrica ocorreu de acordo com o seguinte protocolo: 100Volts (V) (100 Volts hora (Vh)), 500V (250Vh), 1000 V (250Vh), 4000 V (2000 Vh), 4000 V (20000 Vh).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a realização da segunda dimensão, as tiras contendo as proteínas do liquido endometrial foram incubadas em solução de equilíbrio I (6 M ureia, 50 mM TRIS-HCl pH 8.8, 29.3% glicerol, 2% SDS, 1% DTT), por 20 minutos e equilibradas novamente em solução II (similar à solução I com 2,5% iodoacetamida no lugar do DTT), por mais 20 minutos. Os géis verticais de poliacrilamida foram preparados entre duas placas de vidro no sistema Mini-PROTEAN® (BIO-RAD). O gel de corrida 12% foi composto por: 12mL de acrilamida, 10mL de tampão pH 8,8, 4mL de SDS 1%, 3mL de glicerol, 11mL de água Milli Q, 17,5µL de TEMED e 125µL de persulfato de amônio.

Com o auxílio de uma pinça, as tiras foram cuidadosamente colocadas sobre o gel. As tiras foram posicionadas com o gradiente de pH em ordem crescente da esquerda para a direita. Foi adicionado agarose 0,5% para a fixação das tiras. Foi utilizado 3 μ L de marcador de peso molecular (Full Range Rainbow™, - 14 a 97kDa) ao lado da extremidade ácida da fita. O sistema foi montado e a cuba preenchida com o tampão de corrida SDS 1X. A corrida teve uma duração de aproximadamente 2,5 horas, com voltagem de 125V e amperagem de 20mA por gel, fornecida por uma fonte de energia (Electrophoresis Power Supply - EPS 301® - Amersham Pharmacia Biotech)

Coloração

Os géis foram corados com azul de Comassie Coloidal conforme Candiano, et al. (2004), modificado por Van Tilburg, et al. (2013). Os géis foram retirados das placas e acondicionados em potes plásticos. A coloração foi realizada em quatro passos: 1- fixação dos géis sob agitação moderada, em solução contendo etanol 30%, ácido fosfórico 2% em água destilada, durante 20 minutos. Este procedimento foi realizado três vezes, colocando-se a cada vez uma solução nova; 2- fixação dos géis, sob agitação moderada, em solução contendo ácido fosfórico 2% em água destilada durante 20 minutos. Este procedimento foi realizado três vezes, colocando-se a cada vez uma solução nova; 3- fixação dos géis sob agitação moderada em solução contendo ácido fosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 15% em água destilada durante 20 minutos. Este procedimento foi realizado uma vez; 4- adição de 1 mL de Comassie Coloidal na solução do passo 3 sob agitação moderada durante 36 horas. Após o término das 36 horas, os géis foram lavados com água destilada até limpeza total e refrigerados.

Digitalização

Os géis foram digitalizados e analisados usando o *software* PDQuest® (versão 8.0.1, BIO-RAD). A medição foi expressa pela porcentagem relativa de pixels, sendo que 100% representam o total das bandas proteicas identificadas.

Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa foi realizada para a identificação das proteínas. As bandas proteicas de relevância estatística 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, pelo sistema de separação de partículas em escala nano (UPLC nanoACQUITY®, Waters, Milford, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa (Q-TOF Micro™, Waters, Milford, EUA). As sequências obtidas foram comparadas para correspondência no banco de dados, disponíveis na internet, no sítio <http://www.swissprot.com>

Análise ontológica das proteínas

Realizou-se análise das proteínas do líquido endometrial que demonstraram diferença significativa entre os tratamentos com o intuito de verificar suas funções moleculares, processos biológicos, e localização. Utilizou-se o programa Strap 1.5 (Cardiovascular Proteomics Center; Boston University School of Medicine)

Análise estatística

Foi realizada análise de variância para avaliação dos dados da densidade óptica relativa de cada banda proteica. O teste de Tukey foi utilizado para identificar as diferenças e considerou-se uma diferença de 5% como significativa. Foram analisados pelo menos 2 géis de boa qualidade por amostra. A frequência de aparecimento das bandas proteicas foi determinada por Qui-quadrado.

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 15mm, através da ultrassonografia transretal realizadas antes das coletas das amostras.

Foram analisados os géis de boa resolução, observando-se 43 bandas proteicas, com ponto isoelétrico entre 4,3 a 10,0 e peso molecular entre 15 e 105 kDa. Do total das bandas proteicas identificadas, com frequência de aparecimento nos géis superior a 60% em pelo menos um dos tratamentos, seis apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 1).

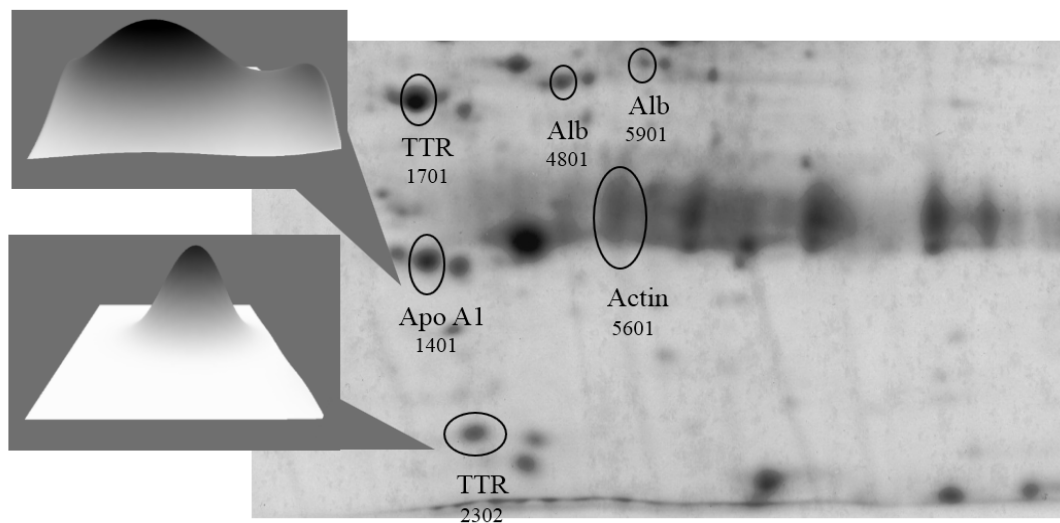


Fig. 1: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) demonstrando o total das bandas proteicas identificadas, que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e com frequência de identificação nos géis de pelo menos um dos tratamentos superior a 60%.

Alb - Albumina, Apo A1 - Apolipoproteína A1, TTR - Transtiretina, Actin - Actina.

A aplicação de dexametasona concomitante com a infecção provocou maior expressão ($p < 0,05$) de duas bandas proteicas (spot 1701 e 2302) quando comparada com as amostras das éguas que somente foram tratadas com dexametasona. Ambas as bandas foram identificadas como transtiretina (Figura 2). Entretanto, não se observaram diferenças na expressão das bandas proteicas quando se compararam as infecções às 6 e 24 horas (I-6 e I-24) com as infecções associadas à aplicação de dexametasona nos mesmos tempos (I/D-6 e I/D-24). O tratamento com dexametasona reduziu ($p < 0,05$) a expressão da apolipoproteína A1 (spot 1401) em relação ao grupo Controle (Figura 3).

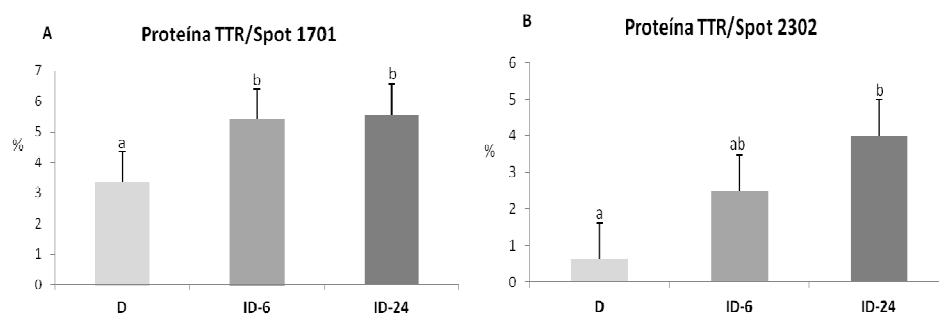


Fig. 2: Densidade óptica (%) relativa das bandas proteicas identificadas, nos grupos dexametasona (D), infecção+dexametasona 6 horas (I/D-6) e infecção+dexametasona 24 horas (I/D-24).

A TTR - Transtiretina (spot 1701) e B TTR (spot 2302)

a,b ($P < 0,05$) letras diferentes representam diferenças significativas.

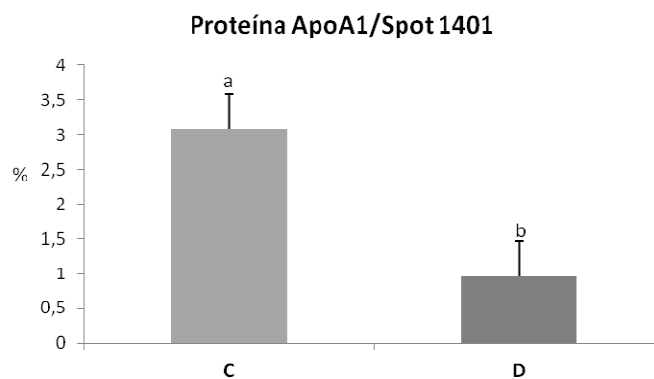


Fig. 3: Densidade óptica (%) relativa da banda proteica identificada, nos grupos Dexametasona (D) e Controle (C).

APO – Apolipoproteína A1 (spot 1401)

a,b ($P < 0,05$) letras diferentes representam diferenças significativas.

A infecção uterina provocou um aumento ($p < 0,05$) da expressão de duas formas de albumina (spots 4801 e 5901) e da actina (spot 5601) em relação ao grupo Controle (Figura 4).

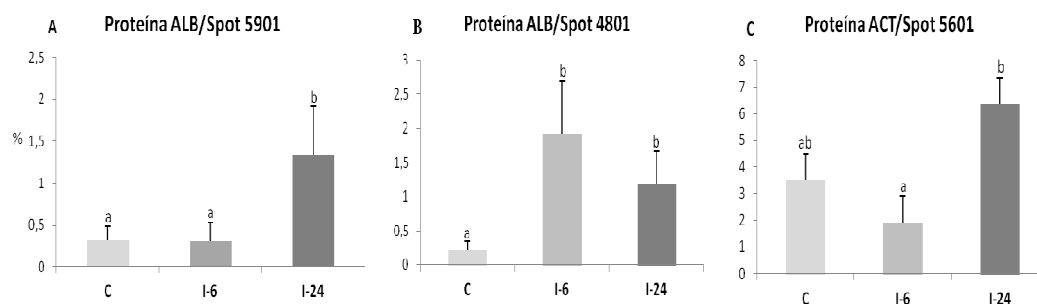


Fig. 4: Densidade óptica (%) relativa das bandas proteicas identificadas, no controle (C), infecção 6 horas (I-6) e infecção 24 horas (I-24).

ALB – Albumina

ACT - Actina

a,b (P<0,05) letras diferentes representam diferenças significativas.

Foi verificado que os processos biológicos das proteínas identificadas estiveram presentes na localização (25%), em processos celulares (25%), na regulação (19%), em processos metabólicos (6%), na interação com células e organismos (6%) e nos processos de desenvolvimento (6%) (Fig. 1). Quando se analisam suas funções moleculares das proteínas constata-se que 67% eram de ligação e 17% de regulação da atividade enzimática. A maioria das proteínas era de origem extracelular (36%), do citoplasma (18%), do citoesqueleto (9%), do endossoma (9%), do núcleo (9%) e dos complexos macromoleculares (18%).

Tabela 1. Análise ontológica das proteínas identificadas no líquido uterino de éguas suscetíveis, que demonstraram diferença significativa entre os tratamentos e frequência de identificação nos géis de pelo menos um dos tratamentos superior a 60%, realizada através da utilização do Strap Database.

Proteína	Processos biológicos	Função molecular	Localização
Albumina	Processo celular Localização Regulação	Ligação Complexo macromolecular	Extracelular
Actina	Processos celulares	Ligação	Intracelular Citoplasma Citoesqueleto Núcleo
Transtiretina	Processo celular Localização Regulação Organização de componentes celulares	Ligação Complexo macromolecular	Extracelular Intracelular Citoplasma
ApolipoproteínaA-1	Processo celular Processo metabólico Processo de desenvolvimento Localização Regulação Interação com células e organismo	Ligação Transporte Atividade reguladora enzimática	Extracelular Intracelular

Discussão

No presente trabalho a administração da dexametasona nas éguas com presença de infecção provocou um aumento na densidade óptica da transtiretina em relação às éguas que foram tratadas somente com dexametasona. Fisiologicamente a TTR possui função de transporte do retinol (vitamina A) através de sua ligação com a RBP (proteína de ligação ao retinol) e da tiroxina (T4) (MONACO, 2000). Além de sua atividade de transporte, a TTR é uma protease. A sua função proteolítica foi revelada a partir da sua interação com a apolipoproteína A1. A atividade proteolítica da TTR é completamente abolida ao formar um complexo com o ligante RBP, enquanto que a ligação da TTR com o T4 possui um impacto mínimo nesta atividade proteolítica (LIZ et al., 2004). Como no plasma sanguíneo 50% da TTR circula ligada à RBP, fisiologicamente apenas 50% da TTR total pode ter atividade proteolítica, portanto, *in vivo* a RBP pode modular

a atividade proteolítica da TTR (LIZ et al., 2010). De 1 a 2% da concentração total da TTR no plasma, circula associada com o HDL, e esta associação ocorre através da ligação da TTR com a Apo A1 (SOUZA et al., 2004). A incubação da TTR com a Apo A1, em condições fisiológicas mostrou que a TTR é capaz de clivar a Apo A1 na sua extremidade C-terminal (LIZ et al., 2004).

O aumento da TTR detectado neste experimento, no grupo de éguas infectadas e tratadas com dexametasona, foi semelhante ao observado por Wolf et al. (2012) utilizando isoflupredona. Maior expressão da TTR é influenciada pelo uso da corticoterapia (JOHNSON et al., 2008; MARTINHO et al., 2012) bem como por doenças infecciosas. Assim, estudos revelam o aumento da TTR em casos de tuberculose bovina (SETH et al., 2009) e humana (WANG et al., 2014). É possível que a TTR ao clivar a Apo A1 possibilite a ação inibitória desta proteína sobre a IL-1 β . Esta potente citocina pró-inflamatória, liberada no início da inflamação (DINARELLO, 2005), inibida pela Apo A1 (HYKA et al., 2001), diminuiu sua expressão três horas após a infecção uterina com *E. Coli* e tratamento concomitante com dexametasona (CHRISTOFERSEN et al., 2012). Da mesma forma, o uso da dexametasona durante um processo inflamatório diminuiu a expressão de mRNA de IL-1 β seis horas após sua aplicação (WOODWARD et al., 2014). Pode-se sugerir um efeito imunomodulador da TTR pela clivagem da Apo A1 diminuindo a IL-1 β .

No estudo realizado por Wolf et al., (2012), além do aumento da TTR, a aplicação de isoflupredona nas éguas com infecção uterina diminuiu a expressão da transferrina e aumentou da α 1-antitripsina. Comportamento da expressão destas proteínas não foi observado no presente experimento com dexametasona. Em estudos clínicos, o uso da isoflupredona em éguas suscetíveis propiciou melhora nas taxas de prenhez (DELL'ACQUA Jr et al., 2006; PAPA et al., 2008) em relação ao controle. A aplicação de dose única de dexametasona, no momento da cobertura, diminuiu o acúmulo de líquido endometrial com redução do edema e da turbidez (BUCCA et al., 2008) após a cobertura. Entretanto, ao utilizar dose única duas horas antes da inseminação Fioratti et al, (2010) não observaram diferenças no volume de fluido uterino recuperado 8 e 24 horas após. O tratamento com dexametasona não afetou a taxa de prenhez em éguas tratadas 6 a 12 horas, com dose única, após a inseminação quando comparado com o grupo controle e não melhorou a prenhez em éguas que tinham fluido uterino antes ou depois da IA (VANDAELE et al. 2010).

As diferenças observadas entre os tratamentos com dexametasona e o acetato de isoflupredona podem ser explicadas pelas suas diferenças farmacológicas. A dexametasona é um corticoide de ação prolongada acima de 48 horas (PLUMB, 2008) podendo chegar até 72 horas. O pico do efeito é de 1 a 2 horas e a meia-vida de eliminação é de 3 a 6 horas, possuindo excreção renal e biliar (HOEFLER, 2008). Por sua vez o acetato de isoflupredona possui um pico de efeito de 1 a 2 horas com duração de 18 horas (CALIL, 2008). Contudo, a penetração no tecido e a duração do efeito dos corticóides são principalmente influenciadas pela sua apresentação química. Assim, os ésteres de insolubilidade moderada como os acetatos, permitem a permanência do medicamento no organismo por dias a meses (JERICÓ & De MARCO, 2011). Portanto, a utilização do acetato de isoflupredona a cada 12 h desde a detecção do estro até a ovulação permite uma ação provavelmente mais duradoura que a da dexametasona com dose única no momento da cobertura ou inseminação.

Foi verificado neste trabalho, que a infecção bacteriana alterou o perfil proteico do líquido uterino sem a presença da corticoterapia, aumentando as concentrações de albumina e actina. Após iniciada a inflamação, os componentes do plasma e leucócitos são concentrados no local inflamado. Além dos efeitos locais, o foco inflamatório pode dar início a um processo contínuo da resposta de fase aguda sistêmica, que vão desde a síndrome da resposta inflamatória sistêmica à imunossupressão generalizada. O processo inflamatório envolve alguns mediadores pró-inflamatórios, que são liberados pelos neutrófilos realizando fagocitose, pelas células do endotélio vascular e células teciduais lesadas e, mais tarde, pelos macrófagos ativados pela inflamação. As principais funções desses mediadores são atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência da eliminação do agente agressor (MACKAY, 2000). Um aumento da síntese de proteínas de fase aguda está associado com a infecção aguda e inflamação, com uma rápida progressão na presença de doenças inflamatórias, levando a uma alteração da síntese proteica (CARAPETO et al., 2006). Por sua vez a dexametasona reduz a inflamação aguda em animais tratados (MARCHIONNI et al., 2006) inibindo o surgimento de leucócitos no local da lesão (FÄSSLER et al., 1996). Inibe ainda a síntese da IL-1 α (interleucina-1 α) e do TNF- α (fator de necrose tumoral- α) que também são quimiotáticos para as células do infiltrado inflamatório crônico (HÜBNER et al., 1996). E na presença de IL-6, é

capaz de regular a produção de pré-albumina (TTR) e de fibrinogênio (THOMPSON et al, 1991).

Houve um aumento da actina nas 24 horas após infecção em relação às 6 horas. A actina é uma proteína presente em todos os eucariontes, sendo o principal componente do citoesqueleto celular (STRYER, 1992), utilizada como um marcador em doenças inflamatórias (KWON et al., 2003; WOLF et al., 2012). O rápido alinhamento e desalinhamento desta APP são de extrema importância para a adesão e extravasamento de neutrófilos para locais inflamados. O movimento dos neutrófilos ocorrem com base na capacidade única da actina de alterar rapidamente entre actina G (filamentosa) e actina F (polimerizada) (WALLACE et al, 1987). Em consequência deste rápido alinhamento, os neutrófilos são capazes de orientar a sua migração e expor seu movimento quimiotático que facilita seu acúmulo nos locais da lesão ou infecção (ZIGMOND, 1977), podendo ser claramente visível durante a infecção microbiana com presença de macrófagos (SHIMADA et al., 1999). Ainda sugere-se que a actina module a migração e a adesão de macrófagos e monócitos (PERRI et al., 2007).

Houve um aumento da albumina nas 6 e 24 horas após infecção em relação ao controle e um aumento também nas 24 horas após infecção em relação às 6 horas. Da mesma forma a albumina aumenta no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite em comparação a pacientes saudáveis (KANOHI et al. 2008) como também, sua síntese pelas glândulas mamárias de vacas com mastite em comparação com vacas sadias. (SHAMAY et al, 2005). A albumina no leite aumenta durante a transição da lactação para involução, da involução para a lactogênese (SORDILO et al., 1987) e durante a inflamação (WATANABE et al., 2000), sugerindo que faz parte do sistema imune inato das glândulas mamárias. Éguas com metrite crônica apresentam aumento na concentração de albumina na secreção uterina devido a uma provável síntese local ou transporte ativo de imunoglobulinas do soro para o útero (WIDDERS et al, 1984).

Conclui-se que a utilização da dexametasona em éguas com e sem infecção altera o perfil proteico do fluido endometrial de éguas suscetíveis. Sugere-se que a dosagem ou a frequência de aplicação da dexametasona deva ser aumentada.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6^o ed. Saunders Elseviers, 2008.

ADAMS, A. A.; BREATHNACH, C. C.; KATEPALLI, M. P.; KOHLER, K.; HOROHOV, D. W. Advanced age in horses affects divisional history of T cells and inflammatory cytokine production. **Mech Ageing Dev**, v. 129, p. 656–664, 2008.

ADAMS, A. A.; KATEPALLI, M. P.; KOHLER, K.; REEDY, S. E.; STILZ, J. P.; VICK, M. M.; FITZGERALD, B. P.; LAWRENCE, L. M.; HOROHOV, D. W. Effect of body condition, body weight and adiposity on inflammatory cytokine responses in old horses. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 127, p. 286–294, 2009.

ALLEN, B. V.; KOLD, S. E. Fibrinogen response to surgical tissue trauma in the horse. **Equine Vet J.**, v. 20, p. 441–443, 1988.

ANANTH, L.; PRETE, P. E.; KASHYAP, M. L. Apolipoproteins A-I and B and cholesterol in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. **Metabolism**, v. 42, p. 803-806, 1993.

ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, v. 17, p. 443-453, 1996.

ANDO, Y. Transthyretin: it's miracle function and pathogenesis. **Rinsho Byori**, v.57, n. 3, p. 228-235, 2009.

ANTUNES, L. J. Células Imunologicamente ativas. Em: ANTUNES, L. J.; MATOS, K. T. F. **Imunologia Médica**. Ed. Atheneu, p. 15-20, 1992a.

ANTUNES, L. J. Interleucinas. Em: ANTUNES, L. J.; MATOS, K. T. F. **Imunologia Médica**. Ed. Atheneu, p. 21-24, 1992b.

ANTUNES, L. J. Ontogenia e imunobiologia das imunoglobulinas. Em: ANTUNES, L. J.; MATOS, K. T. F. **Imunologia Médica**. Ed. Atheneu, p. 43-44, 1992c.

ANTUNES, L. J. Sistema do Complemento. Em: ANTUNES, L. J.; MATOS, K. T. F. **Imunologia Médica**. Ed. Atheneu, p. 45-52, 1992d.

ASBURY, A. C. Failure of uterine defense mechanisms. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine 2**. Philadelphia, W.B. Saunders, p. 508-511, 1987.

ASBURY, A. C.; HALLIWELL, R. E.; FOSTER, G. W.; LONGINO, S. J. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. **Theriogenology**, v. 14, p. 299-308, 1980.

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.

BARBERA, M.; FIERABRACCI, V.; NOVELLI, M.; BOMBARA, M.; MASIELLO, P.; BERGAMINI, E.; DE TATA, V. Dexamethasone-induced insulin resistance and pancreatic adaptative response in ageing rats are not modified by oral vanadyl sulfate treatment. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 145, n. 6, p. 799-806, 2001.

BARTH, B. M.; STEWART-SMEETS, S.; KUHN, T. B. Proinflammatory cytokines provoke oxidative damage to actin in neuronal cells mediated by rac1 and nadph oxidase. **Molecular and cellular neuroscience**, v. 41, p. 274–285, 2009.

BARUA, B.; FAGNANT, P. M.; WINKELMANN, D. A.; TRYBUS, K. M.; HITCHCOCK-DEGREGORI, S. E. A periodic pattern of evolutionarily conserved basic and acidic residues constitutes the binding interface of actin-tropomyosin. **The journal of biological chemistry**, v. 288, n. 14, p. 9602–9609, 2013.

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

BECKER, E. L. Chemotactic factors of inflammation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 4, n.5, p. 223-225, 1983.

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 O₂⁻ production and degranulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 49, n. 3, p. 236-244, 1991.

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

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTOS, B. A. **Fisiologia**, 5^o ed, Elsevier Editora LTDA, 2004.

BEVIER, D.E. Atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Clinics of North America**, v. 20, p. 7-10, 1990.

BIASUCCI, L. M.; D'ONOFRIO, G.; LIUZZO, G.; ZINI, G.; MONACO, C.; CALIGIURI, G.; TOMMASI, M.; REBUZZI, A. G.; MASERI, A. Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction but its reduction is not related to ischemia. **J Am Coll Cardiol.**, v. 27, p. 611-616, 1996.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 2, 2007.

BORBA, E. V. C.; CAMOZZATO, G. C.; MALSCHITZKY, E.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; MARTINS, A. A.; MATTOS, R. C.; NEVES, A. P. Is the presence of uterine fluid a reliable indicator of endometrial inflammation? **Pferdeheilkunde**, v. 28, p. 27-29, 2012.

BOUMPAS, D. T., CHROUSOS, G. P., WILDER, R. L., CUPPS, T. R., BALOW, J. E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Ann. Intern. Med.**, v. 119, p. 1198–1208, 1993.

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, 2004.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD TL, VARNER DD.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. Endometritis **Manual of equine reproduction**, 3rd edition, Mosby Elsevier, 59-68, 2011.

BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. **Proc Am Assoc Equine Pract**, v. 49, p. 363-365, 2003.

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.

CALAMITA, Z.; BURINI, R. C. Fatores reguladores dos níveis plasmáticos de transtiretina e proteína ligadora do retinol. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 29, p. 148-53, 1993.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CALIL, S. S. **Formulário Terapêutico Nacional**, 1º ed, Textos básicos de saúde, p. 129-130, 2008.

CARAPETO, M. V.; BARRERA, R.; MAÑE, M. C.; ZARAGOZA, C. Serum α -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.

CAREY, L.; MITNIK, L. Trends in DNA forensic analysis. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1386–1397, 2002.

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

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

CHAPWANYA, A.; KIERAN, G.; MEADE, A.; MICHAEL, L.; DOHERTY, B.; JOHN, J.; CALLANAN, B.; JOHN, F.; MEE, C.; O'FARRELLY, C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v. 71, p. 1396–1407, 2009.

CHRISTOFFERSEN, M.; WOODWARD, E. M.; BOJESEN, A. M.; PETERSEN, M. R.; SQUIRES, E. L.; LEHN-JENSEN, H.; TROEDSSON, M. H. T. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**, v. 78, p. 991–1004, 2012.

CHROMY, B. A.; PERKINS, J.; HEIKBRINK, J. L.; GONZALES, A. D.; MURPHY, G. A.; FITCH, J. P.; MCCUTCHEM-MALONEY, S. L. Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbours. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 474–479, 2004.

COHEN, N. D.; CHAFFIN, M. K.; VANDENPLAS, M. L.; EDWARDS, R. F.; NEVILL, M.; MOORE, J. N.; MARTENS, R. J. Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J.*, v. 37, n. 3, p. 212–216, 2005.

CHU, S. T.; LEE, Y. C. Characterization of Acute-Phase Proteins (Apps). In: **Inflammatory Diseases - Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases** Edited by Dr Mahin Khatami, p. 299–318, 2012.

CORNELISSE, C.J.; ROBINSON, N.E.; BERNEY, C.E.; KOBE, C.A.; BORUTA, D.T.; DERKSEN, F.J. Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. **Equine Vet. J.**, v. 36, p. 426–30, 2004.

CORRÊA, C. R.; BURINI, R. C. Proteínas plasmáticas positivas à fase aguda. **J. Bras. Patol.**, v. 36, n. 1, p. 48–56, 2000.

CORRÊA, C. R.; ANGELELI, A. Y. O.; CAMARGO, N. R.; BARBOSA, L.; BURINI, R. C. Comparison of PCR/albumin ratio with prognostic inflammatory nutritional index (PINI). **Rio de Janeiro**, v. 38, n. 3, p. 183–190, 2002.

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.

CUENDA, A.; ROUSE, J.; DOZA, Y. N.; MEIER, R.; COHEN, P.; GALLAGHER, T. F.; YOUNG, P. R.; LEE, J. C. SB2b03580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue that is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. **FEBS Lett**, v. 364, p. 229–233, 1995.

CYNOBER, L. Basics in clinical nutrition: Some laboratory measures of response to nutrition in research and clinical studies. **E-SPEN, The European e- Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**. v. 4, p. 226–228, 2009.

DABROWSKI, R.; WAWRON, W, KOSTRO, K. Changes In CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. **Theriogenology**, v. 67, p. 321–327, 2007.

DASCANIO, J. J. External Reproductive Anatomy. In: McKinnon, A. O.; Squires, E. ; Vaala, W. E.; Varner, D. D. **Equine Reproduction**, 2 ed, Wiley-Blackwell, p. 1577-1581, 2011.

DAUGHERTY, A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. L.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **J Clin Invest.**, v. 94, p. 437-444, 1994.

DAVIS, H. A.; STANTON, M. B.; THUNGRAT, K.; BOOTHE, D. M. Uterine arterial isolates from mares and their resistance to antimicrobials: 8,296 cases (2003-2008). **J Am Vet Med Assoc.**, v. 242, n.7, p. 977-983, 2013.

DE SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. Analise de Proteomas: O despertar da era pos-genomica. Revista on line-**Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**. p. 12-14, 2003.

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. Blocking IL-1 in systemic inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 1355-1359, 2005.

DODSON, C. S., K.; RENGARAJAN, H. D.; GEWANT, E.; STODULKOVA, H. T.; NGUYEN, J. H.; BOATRRIGHT.; NICKERSON, J. M. Extra-hepatic expression of serum albumin mRNA in mouse retina. **Curr. Eye Res.**, v. 22, p. 182–189, 2001.

DUMAN, C.; ÇOLAK, T.; BAMAÇ, B.; GÖKER, I.; ÇOLAK, S.; ÖZBEK, A. Ischemia-modified albumin levels in professional male soccer players before and after training. **Marmara Medical Journal**, v. 26, p. 21-24, 2013.

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.

ENGLAND, G.C.W.; MOXON, R.; FREEMAN, S.L. Delayed uterine fluid clearance and reduced uterine perfusion in bitches with endometrial hyperplasia and clinical management with postmating antibiotic. **Theriogenology**, v. 78 p.1611–1617, 2012.

FÄSSLER, R.; SASAKI, T.; TIMPL, R.; CHU, M.; WERNER, S. Differential regulation of fibulin, tenascin-C, and nidogen expression during wound healing of normal and glucocorticoid – treated mice. **Experimental Cell Research.**, v. 222, n. 1, p.111-6, 1996.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science.**, v. 246, p. 64–71, 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.

FERRER MS, LYLE SK, PACCAMONTI DL, EILTS BE, HOSGOOD G, GODKE RA. Persistent breeding-induced endometritis after hysteroscopic insemination in the mare. **Reprod Domest Anim**, v, 47, n. 5, p. 732-739, 2012.

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.

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. 121, p. 113-114, 2010.

FOX, P.; HUDSON, M.; BROWN, C.; LORD, S.; GEBSKI, V.; DE SOUZA, P.; LEE, C. K. Markers of systemic inflammation predict survival in patients with advanced renal cell cancer. **Br J Cancer.**, v. 109, n. 1, p. 147-53, 2013.

FUMUSO, E. A.; AGUILAR, J.; GIGUERE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 118, p. 30–39, 2007.

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.

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. [Proteomic analysis of bovine yolk sac]. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; PIZA, A. R. T.; RESENDE, L. C.; MARIA, D. A.; MIGLINO, M. A. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. **Enciclopédia biosfera**, v.6, n.11, p. 1-24, 2010.

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.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GUNTHER, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 9, p. 531-546, 1988.

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

GÖRG, A.; POSTEL, W.; WESER, J.; GÜNTHER, S.; STRAHLER, J. L.; HANASH, S. M.; SOMERLOT, L. Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. **Electrophoresis**, v.8, p. 122-124, 1987.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.: Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 39-63, 2002.

GROSS, B.A. Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. **BioMEMs.**, v. 7, p. 5129, 2004.

GRUNFELD, C.; PANG, M.; DOERRLER, W.; SHIGENAGA, J. K.; JENSEN, P.; FEINGOLD, K. R. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 74, n. 5, p. 1045-1052, 1992.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLDB, 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.

GURSKY, O.; JONES, M. K.; MEI, X.; SEGREST, J. P.; ATKINSON, D. Structural basis for distinct functions of the naturally occurring Cys mutants of human apolipoprotein A-I. **Department of Physiology and Biophysics**, 2013.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8^oed., Guanabara Koogan, 1992.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Medical Physiology**. 12^oed., Saunders Elsevier, 2006.

HAYNES, JR., R. C; MURAD, F. Em **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Goodman, L.S.; Gilman, A.G., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 943, 1987.

HEINRICH P. C., CASTELL J. V., ANDUS T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem. J.**, v. 265, p. 621- 636, 1990.

HERATH, S.; FISCHER, D. P.; WERLING, D.; WILLIAMS, E. J.; LILLY, S. T.; DOBSON, H, BRYANT, C. T.; SHELDON, I, M. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562–570, 2006.

HINRICHS, K.; CUMMINGS, M. R.; SERTICH, P. L.; KENNEY, R. M. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 193, p. 72–75, 1988.

HOEFLER, R. **Formulário Terapêutico Nacional**, 1^o ed, Textos básicos de saúde p. 126-127, 2008.

HOLNESS, M. J.; SMITH, M. D.; GREENWOOD, G. K.; SUGDEN, M. C. Interactive influences of peroxisome proliferator-activated receptor α activation and glucocorticoids on pancreatic beta cell compensation in insulin resistance induced by dietary saturated fat in the rat. **Diabetologia.**, v. 48, n. 10, p. 2062-2068, 2005.

HÜBNER, G.; BRAUCHLE, M.; SMOLA, H.; MADLENER, M.; FÄSSLER, R.; WERNER, S. Differential regulation of proinflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Cytokine.**, v. 8, n. 7, p. 548-56, 1996.

HULTÉN, C.; GRONLUND, 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 alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. **Equine Vet J.**, v. 34, p. 699–704, 2002.

HULTÉN, C.; SANDGREN, B.; SKIÖLDEBRAND, E.; KLINGEBORN, B.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. **Acta Vet Scand.**, v. 40, n.4, p. 323-333, 1999.

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.

INGBAR, S. H. Pre-albumin: a thyroxin binding protein of human plasma. **Endocrinology**, v. 63, p. 256-9, 1958.

INGENBLEEK, Y.; CARPENTIER, Y. A. A prognostic inflammatory and nutritional index scoring critically ill patients. **Int J Vitam Nutr Res.**, v. 55, n.1, p. 91-101. 1985.

JACOBSEN, S.; NIEWOLD, T. A.; HALLING-THOMSEN, M.; NANNI, S.; OLSEN, E.; A, CASPER LINDEGAARD, C.; ANDERSEN, P. H. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, p. 325-330, 2006.

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.

JERICÒ, M. M.; De MARCO, V. Anti-inflamatórios esteroidais. Em: **Farmacologia aplicada em Medicina Veterinária**. SPINOSA, E. S.; GÒSNIK, S.L.; BORNARDI, M. M. 5° ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 261 - 271, 2011.

JIANG, H.; CHEN, R. R.; WANG, H. C.; PU, H. L. Studies on the binding of vinpocetine to human serum albumin by molecular spectroscopy and modeling. **Chin Chem Lett**, v. 23, p. 599-602, 2012.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; WALD, V. B.; HORN, A. P; MATTOS, R. C. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 63,n. 7, p. 2053-2062, 2005.

JOHNSON, A. M.; MERLINI, G.; SHELDON, J.; ICHIHARA, K. Clinical indications for plasma proteins assays: transthyretin (prealbumin) in inflammation and malnutrition. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, p. 419-426, 2007.

JOHNSON, A. M.; MERLINI, G.; SHELDON, J.; ICHIHARA, K. Indicaciones clínicas para los ensayos de proteínas plasmáticas: transtiretina (prealbúmina) en inflamación y desnutrición. **Acta Bioquím Clín Latinoam.**, v. 42, n. 2, p. 279-88, 2008.

JÚNIOR, R. Q. B.; MARTINS, G. R.; BARROSO, I. C.; MARINHO, R. C.; AGUIAR, T. D. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.100-112, 2013.

KABSCH, W.; MANNHERZ, H. G.; SUCK, D. Three-dimensional structure of the complex of actin and DNase I at 4.5 Å resolution. **The EMBO Journal**, v. 4, n. 8, p. 2113-2118, 1985.

KABSCH, W.; MANNHERZ, H. G.; SUCK, D.; PAI, E. F.; HOLMES, K. C. Atomic structure of the actin:DNaseI complex. **Nature**, v. 347, p. 37-44, 1990.

KAMEDA, T.; YOKO USAMI, Y.; SHIMADA, S.; HARAGUCHI, G. O.; MATSUDA, K.; SUGANO, M.; KURIHARA, Y.; ISOBE, M.; TOZUKA, M. Determination of Myeloperoxidase-Induced apoAI-apoAII Heterodimers in High-Density Lipoprotein. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 42, n. 4, 2012.

KANO, Y.; OHARA, T.; KANO, M.; AKAHOSHI, T. Serum Matrix Metalloproteinase-2 Levels Indicate Blood–CSF Barrier Damage in Patients with Infectious Meningitis. **Inflammation**, v. 31, n. 2, 2008.

KATILA, T. Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. **Reprod Dom Anim**, v. 47 n.5, p. 31–41, 2012.

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

KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 172, p. 24, 1978.

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

KERRY-ANNE. R. Y. E. Biomarkers associated with high-density lipoproteins in atherosclerotic kidney disease. **Japanese Society of Nephrology**, v. 10, p. 1007, 2013.

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.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik**, v. 26, n. 3, p. 231-243, 1975.

KOLM, G.; KLEIN, D.; KNAPP, E.; WATANABE, K.; WALTER, I. Lactoferrin expression in the horse endometrium: relevance in persisting mating-induced endometritis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 114, p. 159–167, 2006

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

KOVALSKI, J. J. Mecanismos da doença infecciosa. Em: **Medicina Interna Equina**. REED, S. M.; BAYLY, W. M. Ed. Guanabara Koogan S.A, RJ, p. 54-56, 2000.

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.

LEBLANC, M. M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reprod Dom Anim** v.45, p. 21-27, 2010.

LEBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine 5**. Philadelphia: WB Saunders, p. 234-237, 2003a.

LEBLANC, M. M.; JOHNSON, R. D.; CALDERWOOD, M. B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Biol Reprod Mono**, 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.; NEUWIRTH.; ASBURY, A. C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurements of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine veterinary Journal**. v. 26, n. 2, p. 109-113, 1994.

LEBLANC, M. M: Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In Ball, B. A: **Recent Advances in Equine Reproduction**. Ithaca, NY, International Veterinary Information Service, 2003b.

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

LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T. Neutrophils and host defense. **Ann Intern Med.**, v. 109, p. 127-142, 1988.

LIZ, M. A.; FARO, C. J.; SARAIVA, M. J.; SOUSA, M. M. Transthyretin, a new cryptic protease. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 21431-21438, 2004.

LIZ, M. A.; MAR, F. M.; FRANQUINHO, F.; SOUSA, M. M. Aboard Transthyretin: From Transport to Cleavage. **IUBMB Life**, v. 62, n. 6, p. 429-435, 2010.

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.

LUO J. C., SHIN, V. Y.; , LIU, E. S. L.; , YE, Y. N.; WU, W. K. K.; , SO, W. H. L.; , CHANG, F. Y.; CHO, C. H. Dexametasone delays ulcer healing by inhibition of angiogenesis in rat stomachs. **Eur J Pharmacol.**, v, 485, p. 275-281, 2004.

LUO, Y.; CORNELIUS, E.; UBOH, C. E.; SOMA, R.; FUYU, G.; RUDY, A.; TSANG, S. Resolution, quantification and confirmation of betamethasone and dexamethasone in equine plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Commun. Mass. Spectrum.** v. 19, p. 825-832, 2005a.

LUO, Y.; UBOH, C. E.; SOMA, L. R.; GUAN, F. Y.; RUDY, J. A.; TSANG, D. S. Simultaneous analysis of twenty-one glucocorticosteroids in equine plasma by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.** v. 19, p. 1245-56, 2005b.

MACKAY, R. J. Inflammation in horses. In: **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice.** Lun, D. P.; Horohov, D. W. Saunders Company, v. 16, n.1, p. 15-27, 2000.

MALSCHITZKY, E.; AGUIAR, P. R. L.; TREIN, C. R.; MATTOS, R. C. Éguas virgens e jovens também podem ser suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura. **Veterinária em Foco**, v. 3, n.2, p.137-146, 2006.

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.

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.

MARCHIONNI, A. M. T.; PAGNONCELLI, R. M.; REIS, S. R. A. Influence of meloxicam and dexamethasone in the inflammatory process and tissue healing. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 51, 2006.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; PARRA, M. D.; CERÓN, J. J. Acute phase proteins: general concepts and main clinical applications in veterinary medicine. **An. Vet.**, v. 17, p. 97-114, 2001.

MARTINHO, A; GONÇALVES, I; COSTA, M; SANTOS, C. R. Stress and Glucocorticoids Increase Transthyretin Expression in Rat Choroid Plexus via Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors. **J Mol Neurosci**, v. 48, p. 1-13, 2012.

MATTOS, R. C; 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.

MATTOS, R. C.; MATTOS, A. L. G.; GUNZEL, A. R.; KLUG, E. Bakteriologische und zytologische Untersuchungen von Uterusabstrichen beim Pferd. **Der Praktische Tierarzt**, v. 65, p. 809-814, 1984.

McDONALD, L. E. Hormônios que influenciam o metabolismo. Em: **Farmacologia e terapeutica veterinária**. JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. Ed. Guanabara Koogan, RJ, 4^{ed}, p. 475 - 486, 2003.

MONACO, H. L. The transthyretin-retinol-binding protein complex. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1482, p. 65-72, 2000.

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-EBERHARD, H. J. COMPLEMENT: CHEMISTRY AND PATHWAYS, In: GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation**, Basic Principles and Clinical Correlations, Raven Press, New York, p. 21-53, 1988.

NEELY, D. P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. **J Reprod Fertil Suppl.**, v. 27, p. 181-189, 1979.

NIEDZIELA, P.; MICHALAK, J.; KOSTRO, K.; GLINSKI, Z.; WOJCICKA-LORENOWICZ, K. CRP protein as a marker for early diagnosis of postimplantation complications of aorto-difemoral graft. **Medycyna Wet**, v. 57, p. 50-53, 2001.

NYMO, S. H.; UELAND, T.; ASKEVOLD, E. T.; FLO, T. H.; KJEKSHUS, J.; HULTHE, J.; WIKSTRAND, J.; MCMURRAY, J.; VAN VELDHUISEN, D. J.; GULLESTAD, L.; AUKRUST, P.; YNDESTAD, A. The association between neutrophil gelatinase-associated lipocalin and clinical outcome in chronic heart failure: results from CORONA. **Journal of Internal Medicine**, v. 10, p. 2796, 2011.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OVELAND, E.; KARLSEN, T. V.; HASLENE-HOX, H.; SEMAEVA, E.; JANACZYK, B.; TENSTAD, O.; WIIG, H. Proteomic evaluation of inflammatory proteins in rat spleen interstitial fluid and lymph during LPS-induced systemic inflammation reveals increased levels of ADAMST1. **J Proteome Res.**, v. 11, p. 5338-5349, 2012.

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.

PARK, Y. B.; LEE, S. K.; LEE, W. K.; SUH, C. H.; LEE, C. W.; LEE, C. H.; SONG, C. H.; LEE, J. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 26, p. 1701-1704, 1999.

PEPYS, M. B. C-reactive protein fifty years on. **Lancet**, v. 1, n. 8221, p. 653–657, 1981.

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.

PERRI, S. R.; ANNABI, B.; GALIPEAU, J. Angiostatin inhibits monocyte/macrophage migration via disruption of actin cytoskeleton. **FASEB J.**, v. 21, p. 3928–3936, 2007.

PETTET G, J.; BYRNE, H. M.; MCELWAIN, D. L. S.; NORBURY, J. A model of wound-healing angiogenesis in soft tissue. **Math Biosci**, v. 136, n. 1, p. 35-63, 1995.

PINEIRO, M.; LAMPREAVE, F.; ALAVA, M. A. Development and validation of an ELISA for the quantification of pig Major Acute phase Protein (Pig-MAP). **Veterinary Immunology and Immunopathology** , v. 127, p. 228–234, 2009.

PLOOG, J. T.; ROMERO, A. R. Evaluación de eficacia y tolerancia de una Solución inyectable sobre la base de fenilbutazona e dexametazona (Cortifen 200.25®) en la resolución de problemas inflamatorios de equinos. **AgrovetMarket**, 2006.

PLUMB, D. C. **Veterinary drug handbook**. 6° ed, Pharma Vet Inc., Wisconsin, p. 265-269, 2008.

POLLOCK, P. J.; PRENDERGAST, M.; SCHUMACHER, J.; BELLENGER, C. R. Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. **Veterinary Record**, v. 156, p. 538-542, 2005.

PROIETTI, P. C.; BIETTA, A.; COPPOLA, G.; FELICETTI, M.; COOK, R. F.; COLETTI, M.; MARENZONI, M. L.; PASSAMONTI, F. Isolation and characterization of b-haemolytic-Streptococci from endometritis in mares. **Veterinary Microbiology**, v. 152, p. 126–130, 2011.

PYCOCK, J. F: Cervical function and uterine fluid accumulation in mares. Proceedings of JP Hughes International Workshop on Equine Endometritis, summarised by W.R. Allen. **Equine Vet J.**, v. 25, p. 191, 1993.

PYCOCK, J. F. Therapy for Mares with Uterine Fluid. In: SAMPER. J. C.; PYCOCK, J. F.; McKINNON, A. O. **Current Therapy in equine reproduction**. Ed Saunders Elsevier, p. 93-104, 2007.

PYCOCK, J. F.; ALLEN, W. E. Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. **Vet Rec.**, v. 123, p. 193, 1988.

QUALTIERI, A.; PERA, M. L.; URSO, E.; BONO, F.; VALENTINO, P.; SCORNAIENCHI, M. C.; QUATTRONE, A. Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, p. 125-133, 2007.

RAHMAN, M. H.; MARUYAMA, T.; OKADA, T.; YAMASAKI, K.; OTAGIRI, M. Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum-albumin .1. mechanism of binding studied by dialysis and spectroscopic methods. **Biochemical pharmacology**, v. 46, p. 1721 - 1731, 1993.

RASMUSSEN, C. D.; HAUGAARD, M. M.; PETERSEN, M. R.; NIELSEN, J. M.; PEDERSEN, H. G.; BOJESEN, A. M. Streptococcus equi subsp. zooepidemicus isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. **Veterinary Research**, v.44, p. 26, 2013.

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.

REID, K. M. B. Classical pathway activation, In: ROTHER, K.; TILL, G. O.; HÄNSCH, G. M. **The Complement System**, ed., Springer-Verlag, Berlin, p. 68–86, 1998.

REILAS, T. Uterine luminal environment of the mare. **Academic dissertation**, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, p. 391, 2011.

RICKETTS, S. W. Uterine and clitoral cultures. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. Volume 2, 2^o ed. Edited by Chichester, United Kingdom: Wiley-Blackwell, p. 1963–1978, 2011.

RICKETTS, S.W. Bacteriological examinations of mare's cervix: techniques and interpretation of results. **Vet. Rec.**, v.108, p.46-51, 1981.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel., p. 659, 1999.

ROBERTSON, S. A, Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. **J Anim Sci.**, v. 85, p. 36–44. 2007.

ROBERTSON, S. A.; MAYRHOFER, G.; SEAMARK, R. F. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. **Biol. Reprod.**, v. 46, p. 1069–1079, 1992.

ROBERTSON, S. A.; SJOBLUM, C.; JASPER, M. J.; NORMAN, R. J.; SEAMARK, R. F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 1206–1215, 2001.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHAES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SA, M. F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 136, p. 1- 12, 2005.

RUZZIN, J.; WAGMAN, A. S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signaling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, v. 48, n. 10, p. 2119-2130, 2005.

SALAMONSEN, L. A.; EDGELL, T.; ROMBAUTS, L. J.; STEPHENS, A. N.; ROBERTSON, D. M.; RAINCZUK, A.; NIE, G.; HANNAN, N. J. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. **Fertil Steril**, v. 99, n. 4, p. 1086-1092, 2013.

SAMPER, J. C.; TIBARY, A. Disease transmission in horses. **Theriogenology**, v. 66, p. 551-559, 2006.

SANTOS, C.L.; RAFACHO. A.; BOSQUEIRO. J, R. Effects of dexamethasone administration in vivo on glycaemia, insulinaemia and circulating substrates are dependents of time of treatment. **Biosci. J.**,v. 23, n. 3, p. 101-110, 2007.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; CORREIA, I. S. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microorganismos. **Boletim de Biotecnologia**, n. 77, p. 7-17, 2004.

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.

SETH, M.; LAMONT, E. A.; JANAGAMA, H. K.; WIDDEL, A.; VULCHANOVA, L.; STABEL, J. R.; WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; SREEVATSAN, S. Biomarker Discovery in Subclinical Mycobacterial Infections of Cattle. **PLOS ONE**, v. 4, n.5, p. 5478, 2009.

SHAMAY, A.; HOMANS, R.; FUERMAN, Y.; LEVIN, I.; H. BARASH, H.; SILANIKOVE, N.; MABJEESH, S. J.. Expression of Albumin in Nonhepatic Tissues and its Synthesis by the Bovine Mammary Gland. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 569-576, 2005.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A.; DOBSON, H. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. **Vet Rec.**, 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.

SHIMADA, O.; ISHIKAWA, H.; TOSAKA-SHIMADA, H.; ATSUMI, S. Rearrangements of actin cytoskeleton during infection with Escherichia coli O157 in macrophages. **Cell Struct Funct.**, v. 24, p. 237-246, 1999.

SILVA, E. N. Mecanismo de imunidade antiinfeciosa. Em: ANTUNES, L. J.; MATOS, K. T. F. **Imunologia Médica**. Ed. Atheneu, p. 67 - 74, 1992.

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.

SOUSA, J. C.; GRANDELA, C.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; DE MIGUEL, R.; DE SOUSA, L.; MAGALHAES, A. I.; SARAIVA, M. J.; SOUSA, N.; PALHA, J. A. Transthyretin is involved in depression-like behaviour and exploratory activity. **J Neurochem**, v. 88, p. 1052-1058, 2004.

STEEL, D. M.; WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: Creactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunol Today**, v. 15, p. 81-88, 1994.

STREYER, L. **Bioquímica**, 3ª edição, Editora Guanabara Koogan S. A, Rio de Janeiro, p. 117-144, 1992.

TAUBER, P. F.; CRAMER, G. M. U.; ZANEVELD, L. J. D. Effect of the intrauterine contraceptive device on protein components of human uterine fluid. **Contraception**, v. 48, p. 494-512, 1993.

THERELFALL, W. R.; IMMEGART, H. M. Doença uterina e tratamento. Em: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**, Ed. Guanabara Koogan, RJ, p. 666-670, 2000.

THOMPSON, D.; HARRISON, S. P.; EVANS, S. W.; WHICHER, J. T. Insulin modulation of acute-phase protein production in a human hepatoma cell line. **Cytokine**, v. 3, p. 619-626, 1991.

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.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology**. ed., WB Saunders Company, Pennsylvania, USA. 1996.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 6 ed. London: Saunders Company, 2000.

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. 461-71, 1999.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M. Managing mares with chronic uterine inflammation” **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 15, p. 305-306, 1995.

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K. Uterine clearance of non-antigenic markers (51Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **J Reprod Fertil Suppl.**, v.44, p. 283–288, 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.

ULUTAS, P. A.; UNSAL, H.; BALKAYA, M.; UNSAL, C. The short-term effects of dexamethasone on the blood concentrations of acute phase proteins (haptoglobin and ceruloplasmin) and trace elements in rats. **Revue Méd. Vét.**, v. 158, n. 11, p. 579-584, 2007.

UROSEVIC, M.; LAKO, B.; MILANOV, D.; UROSEVIC, I.; AURICH, C. Results of bacteriological and cytological examinations of the endometrium of subfertile mares in stud farms in Serbia. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.**, v. 123, n. 9-10, p. 365-368, 2010.

VAN LEEUWEN, M. A.; VAN RIJSWIJK, M. H. Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders. **Baillieres Clin. Reumatol.**, n. 8, p. 531-552, 1994.

VAN TILBURG, M. F.; RODRIGUES, M. A.; MOREIRA, R. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; CÂNDIDO, M. J.; MOURA, A. A. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, p. 1247-1261, 2013.

VANDAELE, H.; DAELS, P.; PIEPERS, S.; LEBLANC, M. Effect of post-insemination dexamethasone treatment on pregnancy rates in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 110-112, 2010.

VANDENPLAS, M. L.; MOORE, J. N.; BARTON, M. H.; ROUSSEL, A. J.; COHEN, N. D. Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. **Am J Vet Res.**, v. 66, n.9, p. 1509-1516, 2005.

VANDEKERCKHOVE, J.; WEBER, K. Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. **J. Mol. Biol.**, v. 179, p. 391-413, 1984.

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

VISSER, M.; KRITCHEVSKY, S. B.; NEWMAN, A. B.; GOODPASTER, B. H.; TYLAVSKY, F. A.; NEVITT, M. C.; HARRIS, T. B. Lower serum albumin concentration and change in muscle mass: the Health, Aging and Body Composition Study. **Am J Clin Nutr.**, v. 82, p. 531–537, 2005.

WALLACE, P. J.; PACKMAN, C. H.; WERSTO, R. P.; LICHTMAN, M. A. The effects of sulfhydryl inhibitors and cytochalasin on the cytoplasmic and cytoskeletal actin of human neutrophils. **J Cell Physiol.**, v. 132, p. 325–330, 1987.

WALLACE, P. J.; WERSTO, R. P.; PACKMAN, C. H.; LICHTMAN, M. A. Chemotactic peptide-induced changes in neutrophil actin conformation. **J. Cell. Biol.**, v. 99, p. 1060, 1984.

WANG, C. L.; COLUCCIO, L. M. New insights into the regulation of the actin cytoskeleton by tropomyosin. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, v. 281, p. 91–128, 2010.

WANG, C.; LI, Y. Y.; LI, X.; WEI, L. L.; YANG, X. Y.; XU, D. D.; JIANG, T. T.; LI, Z. J.; CHEN, Z. L.; ZHANG, X.; LIU, J. Y.; PING, Z. P.; LI, J. C. Serum complement C4b, fibronectin, and prolidase are associated with the pathological changes of pulmonary tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 52, 2014.

WATANABE, A.; YAGI, Y.; SHIONO, H.; YOKOMIZO, Y. Effect of intramammary infusion of tumour necrosis factor- α 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.; STOKES, C. R.; BOURNE, F. J. Cellular and humoral mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 16, p. 107-112, 1987.

WENYING, H.; YING, L.; CHUNXIA, X.; ZHIDE, H.; XINGGUO, C. FENLING, S. Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1837–1845, 2005.

WEISGRABER, K. H.; BERSOT, T. P.; MAHLEY, R. W. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the a-i apoprotein from human high density lipoproteins. **The American Society for Clinical Investigation**, v. 66, p. 901-907, 1980.

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.

WILLIAM, B. L. **Broodmare Reproduction for the equine practitioner**. Ed. Teton New Media, p. 161-178, 2003.

WITTE TS, MELKUS E, WALTER I, SENGE B, SCHWAB S, AURICH C, HEUWIESER W. Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in estrous mares. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1199-208, 2012.

WITTENBRINK, M. M. Bacterial infections of the equine genital tract. **Pferdeheilkunde**, v. 28, p. 30-32, 2012.

WITTENBRINK, M. M.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L. E. What's new in bacteriology of the mare's genital tract. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 53–55, 2008.

WOLF, C. A.; MALSCHISTKY, E.; DAVOLLI, G. M.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Persistent post-breeding endometritis: effect of a corticosteroid treatment on the number of protein bands from uterine endometrial fluid of susceptible mares. **Pferdeheilkunde**, v. 26, p. 22-24, 2010.

WOLF, C. A.; MALSCHISTKY, E.; GREGORY, R. M.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis. **Theriogenology**, v. 77, p. 1351–1359, 2012.

WOODS, N. K.; PADMANABHAN, J. Inhibition of amyloid precursor protein processing enhances gemcitabine-mediated cytotoxicity in pancreatic cancer cells. **J Biol Chem.**, doi: 10.1074/jbc.M113.459255, 2013.

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 495-501, 2012.

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; BETANCOURT, A.; HOROHOV, D.; SCOGGIN, K. E.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistentbreeding-induced endometritis. **Reproduction**. v. 145 ,n.3, p. 289-96, 2013.

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; HOROHOV, D.; SQUIRES, E. L.; M. TROEDSSON, H. T. The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. **Equine Veterinary Journal** ISSN 0425-1644 DOI: 10.1111/evj.12266, 2014.

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.

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.

ZIGMOND, S. H. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. **J Cell Biol.**, v. 75, p. 606–616, 1977.