



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA A CICLO UNICO
IN
MEDICINA VETERINARIA**

*ENDOMETRITE POST-COITALE PERSISTENTE: LA CORRETTA GESTIONE DELLE
FATTRICI SUSCETTIBILI ALLA LUCE DELLE NUOVE ACQUISIZIONI
SCIENTIFICHE.*

Relatrice:

Dott.ssa *Maria Elena Falomo*

Dipartimento di scienze cliniche veterinarie

Laureanda:

Mara Della Marianna

Matricola n. 463705

ANNO ACCADEMICO 2011- 2012

INDICE

1 INTRODUZIONE	3
1.1 ENDOMETRITE	3
1.2 ENDOMETRITE POST-COITALE	4
1.3 ENDOMETRITE POST-COITALE PERSISTENTE	6
2 LA RISPOSTA INFIAMMATORIA AL SEME	8
2.1 EFFETTI DEL SEME	8
2.1.1 INTERAZIONE NEUTROFILI – SPERMATOZOI	9
2.1.2 IL RUOLO DEL PLASMA SEMINALE	12
2.2 I MEDIATORI INFIAMMATORI	15
2.3 POSSIBILI IMPLICAZIONI PER L’INSTAURARSI DELLA GRAVIDANZA.....	17
2.4 EFFETTI A LIVELLO DEGLI ORMONI OVARICI.....	19
3 LA CLEARANCE UTERINA	20
3.1 LA CONTRATTILITA’ DEL MIOMETRIO	21
3.2 IL DRENAGGIO LINFATICO.....	24
3.3 IL RUOLO DELLA CERVICE	24
3.3.1 ANATOMIA E ISTOLOGIA.....	25
3.3.2 FISILOGIA.....	27
3.3.3 VALUTAZIONE DELLA CERVICE	27
3.3.4 CONDIZIONI PATOLOGICHE	28
3.3.5 DRENAGGIO CERVICALE	29
3.4 ALTRE ALTERAZIONI ANATOMICHE	30
3.5 IL MUCO	31
3.6 LE INFLUENZE ORMONALI: EFFETTI DEGLI STEROIDI OVARICI	32
3.7 ETA’ E NUMERO DI PARTI	33
4 IL RUOLO DEGLI AGENTI INFETTIVI	35
4.1 EZIOPATOGENESI DELL’ ENDOMETRITE INFETTIVA CRONICA	36
4.2 BIOFILM.....	36
5 RICONOSCERE LE FATTRICI SUSCETTIBILI : DIAGNOSI.....	38
5.1 DEFINIZIONE DI SUSCETTIBILITÀ	38

5.1.1 IMMUNITÀ UMORALE E CELLULARE.....	39
5.1.2 LEUCOCITI POLIMORFONUCLEATI.....	40
5.2 DIAGNOSI.....	41
5.2.1 ECOGRAFIA.....	42
5.2.2 CITOLOGIA E COLTURA UTERINA.....	43
6 INSEMINAZIONE ARTIFICIALE	48
6.1 PLASMA SEMINALE	48
6.2 CONCENTRAZIONE E NUMERO TOTALE DEGLI SPERMATOZOI E VOLUME DELLA DOSE INSEMINANTE	49
6.3 QUALITÀ DELLO SPERMA.....	50
6.4 SITO E TECNICA INSEMINATIVA	51
6.5 GLI EXTENDERS MODULANO L' INFIAMMAZIONE.....	52
6.6 GESTIONE DELL'INSEMINAZIONE ARTIFICIALE	52
7 TERAPIA.....	54
7.1 ANTIINFIAMMATORI	56
7.2 MUCOLITICI	58
7.3 COMPOSTI CHELANTI	61
CONCLUSIONI	64
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	66

1 INTRODUZIONE

L'endometrite post-coitale persistente è al terzo posto tra i problemi medici più comuni delle cavalle adulte, dopo le coliche e i disturbi del tratto respiratorio (Traub Dargatz *et al.*, 1991), ed è la principale causa di fallimento del concepimento (Gutjahr *et al.*, 2000). Colpisce circa il 15 % delle fattrici purosangue dopo la monta naturale (Zent *et al.*, 1998). A causa di questo effetto negativo sulla fertilità l'endometrite post-coitale persistente è la preoccupazione principale di allevatori e veterinari (Watson, 2000).

1.1 ENDOMETRITE

L'endometrite è una comune causa di infertilità nella fattrice. In passato si riteneva che questa patologia fosse semplicemente il risultato della contaminazione batterica; successivamente venne dimostrato che cavalle giovani e sane possedevano una naturale resistenza nei confronti di un'infezione batterica indotta sperimentalmente e si concluse che dovesse esistere qualche meccanismo di difesa locale responsabile della rapida *clearance* batterica (Hughes e Loy, 1969). Studi successivi misero in evidenza la natura multifattoriale dell'endometrite e permisero di suddividere questa patologia in quattro categorie: endometrite degenerativa cronica (endometriosi), endometrite infettiva acuta, endometrite infettiva cronica ed endometrite post-coitale persistente (Pycock, 2009). Il fattore più critico nella prevenzione di questa patologia è la *clearance* meccanica dei contenuti uterini dopo il parto o l'accoppiamento (Troedsson, 2006). La *clearance* meccanica può essere indebolita da alterazioni anatomiche come un utero pendulo o una cervice incompetente o da alterazioni degenerative come la diminuita contrattilità del miometrio, l'elastosi vascolare o la linfangectasia.

L'endometrite può anche essere influenzata dall'intervento di microrganismi patogeni e dalla conseguente risposta immunitaria della fattrice (LeBlanc 2010).

In passato i tassi di concepimento considerati accettabili variavano tra 50 e 60%, attualmente si aggirano attorno ai 75-85%. Questo aumento è dovuto alle maggiori conoscenze riguardo alla patofisiologia dell'endometrite e delle cause di infertilità nella cavalla (Liu e Troedsson, 2008).

1.2 ENDOMETRITE POST-COITALE

L'infiammazione post-coitale dell'endometrio è una risposta ai materiali esogeni che vengono introdotti direttamente nell'utero al momento dell'accoppiamento (Troedsson *et al.*, 2001): seme, *extenders* (nel caso di inseminazione artificiale), batteri ed altri detriti (Troedsson, 1999; Troedsson *et al.*, 2001; Causey, 2006). La risposta infiammatoria dell'endometrio innescata da questi antigeni è un evento normale, prevedibile e fisiologico (Troedsson *et al.*, 2001). L'infiammazione si rende generalmente evidente tra mezzora e un ora dopo l'accoppiamento o l'inseminazione (Katila, 1996) ed è necessaria per rimuovere spermatozoi non vitali e batteri dal lume uterino (Troedsson, 1999).

L'influsso di polimorfonucleati (PMN) nel lume uterino e la loro attività di fagocitosi (Katila, 1996; Troedsson, 1999; Troedsson *et al.*, 2001) è seguita da contrazioni miometriali regolate dalla prostaglandina F_{2α} e dall'ossitocina (Troedsson, 1999). Questo meccanismo di difesa uterino raggiunge il picco attorno alle sei-dodici ore post-inseminazione e nella cavalla normale la maggior parte dei sottoprodotti infiammatori viene eliminata entro quarantotto ore (Katila, 1996).

Siccome l'embrione lascia la tuba uterina e raggiunge il lume uterino circa cinque-sei giorni dopo l'ovulazione (Betteridge *et al.*, 1982), l'infiammazione uterina deve essere sotto controllo almeno novantasei ore dopo l'inseminazione per massimizzare la sopravvivenza embrionale (Troedsson, 1999). Le fattrici suscettibili all'endometrite post coitale persistente non sono in grado di eliminare i fluidi infiammatori in questo breve intervallo di tempo e la prolungata infiammazione che ne risulta

genera un ambiente embriotossico (Troedsson, 1999; Troedsson *et al.*, 2001). Inoltre i prodotti del complemento, leucotriene A, prostaglandina E e prostaglandina F₂α, causano la lisi prematura del corpo luteo e la conseguente carenza di progesterone e contribuiscono alla mortalità embrionale (Rambags, 2003).

L'infiammazione prolungata può essere causata da numerosi fattori:

- Inseminazione artificiale (IA) eseguita più di dodici ore dopo l'ovulazione. Infatti al crescere dei livelli di progesterone diminuiscono le difese e la *clearance* uterina (Katila, 1996; Watson *et al.*, 2001). Al contrario l'IA performata tra le dodici ore precedenti l'ovulazione e le quattro-otto ore dopo l'ovulazione non hanno effetti sull'accumulo di fluidi intrauterini o sul tasso di concepimento (Watson *et al.*, 2001).
- Due IA in ventiquattro ore durante l'estro in assenza di plasma seminale (PS) riducono profondamente la fertilità dal momento che la seconda inseminazione interviene quando l'infiammazione uterina è al suo picco (Alghamdi *et al.*, 2004). Nonostante gli spermatozoi possano sopravvivere anche in un ambiente uterino infiammato da una precedente inseminazione, la loro motilità è progressivamente ridotta dalla loro aggregazione ai PMN (Alghamdi *et al.*, 2001). Questo risulta in una riduzione del numero di spermatozoi vitali che raggiungono le tube per la fertilizzazione (Alghamdi *et al.*, 2004; Troedsson *et al.*, 2005).
- L'uso di seme con ridotto PS risulta in una più marcata e prolungata risposta infiammatoria poiché il PS è un modulatore della risposta infiammatoria post-coitale e protegge gli spermatozoi vitali da opsonizzazione e fagocitosi (Troedsson *et al.*, 2001).
- Si ritiene comunque che il fattore principale nella predisposizione all'endometrite post-coitale persistente sia una riardata *clearance* uterina (*delayed uterine clearance* o DUC) nei confronti di batteri,

fluidi e detriti presenti nell'utero in seguito all'accoppiamento (Troedsson, 1999).

1.3 ENDOMETRITE POST-COITALE PERSISTENTE

Il termine endometrite post coitale persistente si riferisce ad una condizione in cui si rileva ecograficamente un accumulo di fluido intrauterino in conseguenza dell'accoppiamento naturale o dell'inseminazione artificiale. È generalmente riconosciuto che l'accumulo di fluidi dipenda dalla DUC (Troedsson, 1999).

L'eliminazione degli spermatozoi e dei sottoprodotti infiammatori è importante per la fertilità. Questo processo si esplica attraverso i vasi linfatici e la cervice e la presenza di contrazioni uterine efficaci è il prerequisito fondamentale. Si ritiene che la principale differenza tra le cavalle sane e quelle suscettibili all'endometrite sia nell'efficienza del drenaggio uterino. (Katila, 2008).

Le cavalle che mostrano accumulo di fluidi dopo l'accoppiamento vengono trattate con ormoni ecbolici, comunemente con ossitocina, e/o lavaggi uterini. In alcuni paesi alle cavalle vengono somministrati di routine anche antibiotici, nonostante i batteri non siano stati associati all'infiammazione post coitale (Kotilainen et al., 1994), nemmeno quando il drenaggio uterino viene impedito per 24 ore chiudendo la cervice (Katila et al., 2012).

Ricerche sono state indirizzate anche verso quei trattamenti che prevengono l'infiammazione: immunomodulatori, corticosteroidi, diluizione del seme etc. Tuttavia un'intensa infiammazione è un importante meccanismo di difesa uterino e non dovrebbe essere attenuato. Infatti un'infiammazione di più lieve entità potrebbe esitare in un ritardo nell'eliminazione dei PMN e in una maggior durata dell'infiammazione (Katila, 2012).

Uno studio recente riguardo l'espressione delle citochine nell'endometrio di cavalle normali e cavalle con DUC dopo AI ha rilevato l'

alterazione nell' espressione di diverse citochine nelle cavalle suscettibili
(Troedsson e Woodward, 2012).

2 LA RISPOSTA INFIAMMATORIA AL SEME

L'endometrite post coitale è stata ampiamente studiata nella cavalla, ma esiste una consistente letteratura anche riguardo a suino e bovino (Katila, 2012). Una risposta infiammatoria transitoria, conseguente alla deposizione del seme nel tratto genitale femminile, è presente infatti in numerose specie. (Robertson, 2007).

Gli spermatozoi, il PS e gli *extenders* partecipano all'induzione dell'infiammazione, inoltre il numero di spermatozoi, la loro concentrazione e vitalità così come il sito di deposizione del seme possono modulare la risposta infiammatoria. Citochine e leucociti polimorfonucleati e mononucleati rappresentano la prima linea di difesa contro gli agenti estranei rappresentati da seme e batteri e servono ad eliminarli, infatti l'efficace rimozione dell'eccesso di seme e dei sottoprodotti infiammatori e il conseguente rapido ritorno dell'endometrio ad una condizione di normalità è un prerequisito fondamentale per l'instaurarsi della gravidanza. L'esposizione del tratto genitale femminile al seme sembra avere anche importanti effetti per la recettività endometriale e lo sviluppo dell'embrione prima dell'impianto.

2.1 EFFETTI DEL SEME

Il seme è composto da spermatozoi e PS che giocano ruoli differenti nell' infiammazione post-coitale. Nell'IA la maggior parte del PS viene rimosso e questo altera la reazione infiammatoria. La dose inseminante include anche *extenders* che differiscono tra loro per composizione e quindi anche per i loro effetti infiammatori (Katila, 2012).

La deposizione del seme nel tratto genitale femminile causa l' infiammazione post-coitale. Gli spermatozoi attivano la cascata del complemento, che risulta nella produzione di composti chemotattici per i neutrofili. Le chemochine sono prodotte da molte cellule immunitarie e dalle cellule endometriali e attirano diversi tipi di leucociti nei tessuti infiammati. La risposta neutrofilica è la prima linea di difesa, ha un inizio

rapido ed è transitoria. I PMN attivati estrudono il loro DNA e formano *neutrophil extracellular traps* (NETs) che imprigionano gli spermatozoi per ucciderli e fagocitarli. I monociti sono reclutati un po' più tardi rispetto ai neutrofili, e si differenziano in macrofagi e cellule dendritiche. Le *antigen-presenting cells* professionali attivano la risposta immunitaria verso gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) paterno che sono presenti sia nel seme che nell'embrione. Questo risulta in un'immunosoppressione funzionale verso questi antigeni. Il PS infatti contiene molecole regolatorie che attivano e controllano la risposta immunitaria stimolando la secrezione di citochine e *growth factors* e dando inizio al rimodellamento tissutale e partecipando al rimodellamento tissutale, all'angiogenesi e allo sviluppo di embrione e placenta. Le azioni del PS si estendono anche alle ovaie: anticipano l'ovulazione e influenzano lo sviluppo del corpo luteo (Katila, 2012).

2.1.1 INTERAZIONE NEUTROFILI – SPERMATOZOI

Miliardi di spermatozoi vengono eiaculati nel tratto genitale femminile, per massimizzare le possibilità di fecondazione, tuttavia solo alcune centinaia raggiungono l'ovidutto. La selezione degli spermatozoi avviene diversi tratti del canale genitale femminile, ma gli spermatozoi morfologicamente normali e vitali hanno maggiori probabilità di raggiungere l'ovidutto. Nella maggior parte delle specie la giunzione utero tubarica funge da serbatoio di cellule spermatiche, permettendo un lento rilascio di spermatozoi nel tratto più craniale dell'ovidutto (Rath *et al.*, 2008).

La maggior parte degli spermatozoi è destinata all'eliminazione. Le cellule spermatiche infatti sono antigeniche per la femmina e un'immunizzazione nei loro confronti porterebbe all'infertilità. Una rapida rimozione del seme è quindi indispensabile per prevenire una risposta immunitaria acquisita verso gli spermatozoi (Hensen, 2011). La reazione infiammatoria innescata dal seme non serve solo ad eliminare

rapidamente gli spermatozoi, ma anche a creare una situazione di immunotolleranza verso gli antigeni paterni (Robertson, 2007).

Né il trasporto né l'eliminazione degli spermatozoi richiedono molto tempo. Le prime cellule spermatiche raggiungono l'ovidutto entro pochi minuti dall'accoppiamento, ma questi non partecipano alla fecondazione (Rodríguez-Martínez et al., 2010). Gli spermatozoi che entrano nell'ovidutto, vi giungono in 8 ore nei ruminanti, 1-2 ore nei suini (Rath et al., 2008) e 0,5-4 ore nel cavallo (Scott, 2000). L'eliminazione degli spermatozoi inizia simultaneamente al trasporto. Frequenti contrazioni uterine iniziano 5-10 minuti dopo l'accoppiamento, trasportando il seme avanti e indietro nell'utero. Durante questa redistribuzione alcuni spermatozoi non tornano nelle corna uterine, ma vengono drenati attraverso la cervice. (Katila et al., 2000).

Le contrazioni uterine che iniziano immediatamente dopo l'accoppiamento o l'inseminazione artificiale sono probabilmente indotte dalla stimolazione meccanica di vagina e cervice che media un rilascio di ossitocina attraverso un riflesso neurogeno (Madill et al., 2000). Anche la sola presenza del verro sembra indurre un rilascio di ossitocina, che promuove l'attività uterina (Langendijk et al., 2005). In seguito le contrazioni del miometrio vengono stimulate dai fluidi presenti nell'utero (Sinnema et al., 2005). Inoltre durante il processo di fagocitosi i PMN rilasciano enzimi e prostaglandina 2 α che contribuiscono alle contrazioni uterine osservate 4-12 ore dopo l'accoppiamento (Troedsson, 1998).

Estrogeni, prostaglandine ed ossitocina sono presenti in grandi quantità anche nel PS di verro, stallone e toro (Klaush and Kyank, 1972; Reiffsteck et al., 1982; Watson et al. 1999). Tuttavia il PS non fa aumentare l'attività uterina nella cavalla (Portus et al., 2005) né nella scrofa (Viring e Einarsson, 1980; Langendijk, 2002).

Nella cavalla gli spermatozoi vengono eliminati per la maggior parte entro 4 ore e quasi completamente in 12 ore. A 24 ore dall'inseminazione artificiale si possono rinvenire solo pochissime cellule spermatiche (Katila, 1995; Sinnema et al., 2005)

I PMN sono le prime cellule ad invadere i tessuti infiammati. Sono presenti in numero elevato nel sangue e vengono reclutati rapidamente mediante l'espressione di molecole di adesione sulla superficie dei leucociti e delle cellule endoteliali. Essi migrano seguendo un gradiente chemotattico iniziato dal tessuto danneggiato (Kaplanski *et al.*, 2003).

Nella cavalla, durante l'estro, è possibile assistere alla marginazione dei neutrofili nei vasi sanguigni, ma l'infiltrazione di PMN nei tessuti non avviene nell'utero normale in assenza d'infiammazione, nella vacca invece i PMN sono rilevati normalmente nell'endometrio in fase estrale (Kenney, 1978).

La presenza degli spermatozoi nell'utero induce una rapida chemotassi di polimorfonucleati che sono rilevabili nell'utero già mezz'ora dopo l'IA nella cavalla e nella scrofa (Katila, 1995). Il numero di PMN raggiunge il picco tra le 4 e le 8 ore nella cavalla (Katila, 1995), in 3-6 ore nella scrofa (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010). e in meno di 2 ore nella vacca (Alghamdi *et al.*, 2009) Il numero rimane elevato per 24 ore, ma in 40-48 ore si riduce a poche unità (Katila, 1995).

In tutte queste specie l'inizio della chemotassi neutrofilica è rapido e la durata dell'infiltrazione dei PMN è relativamente corta. Questo assicura una rapida rimozione di seme e batteri e il conseguente ritorno dell'endometrio alla normalità, pronto a ricevere l'embrione.

Qualunque tipo di seme o fluido, infuso nell'utero, è in grado di causare endometrite nella cavalla e nella scrofa (Kotilainen *et al.*, 1994; Schuberth *et al.*, 2008), ma gli spermatozoi evocano la risposta neutrofilica più forte (Kotilainen *et al.*, 1994). Gli spermatozoi non sono intrinsecamente chemotattici, ma attivano la cascata del complemento nelle secrezioni uterine, ciò è stato dimostrato nella cavalla e nella scrofa (Troedsson *et al.*, 2005). La cascata del complemento media una serie di azioni biologiche, inclusa la permeabilità vasale, la chemotassi e l'opsonizzazione per la fagocitosi. L'attivazione della cascata del complemento cliva il fattore C5 in C5a e C5b. Il primo è quello che media la chemotassi dei PMN (Tizard, 1996).

I PMN attivati legano e fagocitano gli spermatozoi. Il legame tra le cellule spermatiche e i PMN può avvenire direttamente con la membrana cellulare del leucocita e in questo caso coinvolge sia un meccanismo diretto recettore-ligando sia l'opsonizzazione (Alghamdi *et al.*, 2009). Oppure può essere mediato da NET (neutrophile extracellular traps). I neutrofili attivati estrudono il loro DNA nucleare e istoni formando NET che imprigionano e uccidono microrganismi e spermatozoi (Alghamdi e Foster, 2005). Tuttavia uno studio recente ha messo in luce la doppia valenza dei NET, in parte utile, ma in parte dannosa per l'endometrio (Galvão *et al.*, 2012).

2.1.2 IL RUOLO DEL PLASMA SEMINALE

Nel toro il seme ha un'elevata concentrazione di spermatozoi in un volume ridotto e così contiene una piccolissima quantità di PS. Il seme dello stallone e del verro invece contengono molto PS. Nei bovini e nell'uomo lo sperma è eiaculato in vagina dove rimane la maggior parte del PS. Nello stallone e nel verro invece il seme è depositato direttamente nell'utero.

Il PS è una miscela di ioni, enzimi, monosaccaridi, lipidi, aminoacidi, proteine e ormoni. La sua funzione è quella di fornire nutrimento e protezione agli spermatozoi e un mezzo per il loro trasporto. Inoltre regola la capacitazione, la reazione acrosomiale e l'interazione tra i gameti (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998).

Il PS svolge funzioni molto importanti nell'infiammazione post-coitale sia per quanto concerne il seme che la risposta del tratto genitale femminile (Robertson, 2007).

La presenza del PS è problematica per la conservazione del seme congelato e refrigerato, per cui il seme viene centrifugato ed il surnatante, incluso il PS, eliminato o ridotto aggiungendo degli *extenders*. Tenendo bene in mente le importanti funzioni del PS sembra sorprendente che le femmine possano concepire anche quando viene rimosso dalla dose

inseminante. Forse è sufficiente un breve contatto per permettere alle adatte proteine del PS di legarsi alla testa dello spermatozoo, è anche possibile che la piccolissima quantità di PS che rimane nel seme, anche dopo il processo di centrifugazione e crioconservazione, sia sufficiente per le normali interazioni tra spermatozoi e utero (Katila, 2012). Tuttavia è stato dimostrato che le cavalle possono rimanere gravide, anche se con bassi tassi di concepimento, in seguito ad inseminazione con seme prelevato dall'epididimo e che quindi non era stato esposto al PS (Papa *et al.*, 2008). Perciò il PS non è un requisito fondamentale per la fertilizzazione, almeno non negli equini.

E' stato dimostrato che il PS svolge un ruolo protettivo per gli spermatozoi, essenziale in un ambiente infiammato. Alghamdi *et al.* (2004) Inseminarono delle fattrici con e senza plasma seminale usando 500×10^6 spermatozoi progressivamente motili dopo aver indotto l'infiammazione 12 ore prima; lo 0,5 % (1/22) delle fattrici concepì in assenza di PS e il 77% (17/22) con il PS (Alghamdi *et al.*, 2004). Ulteriori sperimentazioni su suini e conigli ottennero risultati simili (Rozeboom *et al.*, 2000; Taylor, 1982).

Gli spermatozoi non vitali sono legati e fagocitati meno prontamente rispetto a quelli vitali in assenza di PS. Il PS sembra favorire il legame con le cellule spermatiche non vitali e ha un ruolo protettivo nei confronti degli spermi vitali (Troedsson, 2005). Alghamdi e Foster (2005) dimostrarono che questa protezione era associata ai NETs: la DNasi presente nel plasma seminale digerisce il DNA estruso dai neutrofili e libera gli spermatozoi imprigionati (Alghamdi e Foster , 2005). Più tardi venne dimostrato che la proteina CRISP3 presente nel plasma seminale equino sopprime il legame tra PMN e spermi regolando l'eliminazione degli spermatozoi (Doty *et al.*, 2011). Questi studi suggeriscono che il legame tra PMN e cellule spermatiche sia selettivo e mediato dal PS.

Risultati contrastanti sono stati riportati nei suini dove virtualmente non c'è legame tra i neutrofili e le cellule spermatiche danneggiate. È stato suggerito che il legame potrebbe avvenire tramite forze deboli dovute ai potenziali di membrana opposti, questo spiegherebbe la repentina perdita

del legame quando le cellule spermatiche vengono danneggiate (Taylor *et al.*, 2008). È un fatto curioso che gli spermatozoi vitali vengano legati prontamente mentre quelli danneggiati non vengono legati. Tuttavia deve esistere un meccanismo di selezione aggiuntivo che si esplica prima che gli spermatozoi entrino nell'ovidutto infatti la maggior parte degli spermatozoi che si rinvencono a livello della giunzione utero tubarica sono morfologicamente normali ed hanno tutti una testa normalmente conformata ed un intimo contatto con l'epitelio (Scott, 2000).

Gli spermatozoi di toro mostrano un basso legame con i PMN in assenza di PS, ma *in vitro* quantità di PS pari o superiori al 10% accrescono il legame e la formazione di NET oltre il normale. Tuttavia l'*egg yolk extender* annulla gli effetti del PS (Alghamdi *et al.*, 2009). Aloe *et al.* (2012) aggiunsero PMN a cellule epiteliali bovine *in vitro* e trovarono che le cellule erano in grado di secernere interleuchina-8 (IL-8) in risposta ai PMN. Il PS blocca IL-8, stimola la tras migrazione dei PMN e riduce le specie reattive dell'ossigeno. Gli effetti del PS sembrano simili nei suini e negli equini (Aloe *et al.*, 2012). Gilbert e Fales (1996) riportarono risultati differenti: il plasma seminale inibiva l'aggregazione dei neutrofilo e sottoregolava il recettore C3b, che è conosciuto come recettore-3 del complemento, mediando la fagocitosi di organismi opsonizzati dal complemento. Questo potrebbe indicare un'attività fagocitaria danneggiata nei neutrofilo esposti al PS; in più la frazione plasmatica seme diminuisce la produzione di anione superossido da parte dei PMN attivati in modo concentrazione dipendente. Così il PS protegge le cellule spermatiche dai danni ossidativi: perossidazione dei lipidi di membrana e alterazioni del DNA (Gilbert e Fales, 1996).

Il plasma seminale suino inibisce la chemotassi dei neutrofilo *in vitro* in modo dose dipendente (Rozeboom *et al.*, 2001). La riduzione del reclutamento di neutrofilo potrebbe spiegare l'effetto protettivo del plasma seminale nei confronti degli spermatozoi.

Inoltre sembra che il PS causi una severa aggregazione di neutrofilo (Taylor *et al.*, 2009). Ciò può spiegare il breve tempo necessario per eliminare i PMN quando è presente il la frezione plasmatica nel seme:

dopo 36 ore dall' IA la presenza di PMN in lavaggi uterini era significativa tra inseminazioni con seme con PBS rispetto al seme con plasma seminale. (Rozeboom et al., 1999). Fiala (2002) e Troedsson et al. (2001) riportarono risultati simili nella cavalla. Un numero significativamente minore di PMN fu recuperato dall' utero 24 ore dopo l'IA quando il PS era incluso nella dose inseminante rispetto all' uso di seme con *extender* benché non ci fossero differenze nel numero di PMN riscontrati a 6 o 12 ore dopo IA. L'autore ne concluse che il SP accorcia la durata dell'inflammazione (Troedsson et al., 2001).

2.2 I MEDIATORI INFIAMMATORI

In seguito all'inoculazione intrauterina di seme e batteri, non si ha solo la migrazione dei PMN nell' endometrio, ma anche accumulo di fluido, che contiene molti mediatori infiammatori che modulano la risposta immunitaria acuta. Le citochine sono i più importanti di questi e sono state l' argomento di molti studi negli anni più recenti. Le cellule endometriali che vengono in contatto col seme sono stimulate a produrre e rilasciare citochine e altri mediatori. Le citochine sono proteine regolatorie secrete dalle cellule del sistema immunitario che agiscono in modo paracrino e autocrino. Le interleuchine (da IL-1 a IL-7) regolano l'interazione tra i linfociti e gli altri leucociti. Gli interferoni ($IFN\alpha$, β , γ , ω , τ) sono glicoproteine sintetizzate in risposta ad infezioni virali, stimoli immunitari o chimici. Il fattore di necrosi tumorale (TNF) deriva dai macrofagi (α) e dalle cellule T (β). Molte citochine sono fattori di crescita, per esempio, il *colony stimulating factor* (CSF) e il *transforming growth factor* β (TGF- β). Le citochine sono regolate dall' espressione di recettori, antagonisti dei recettori, proteine leganti e altre citochine che esercitano effetti opposti (Tizard, 1996).

IL-8 è una molecola proinfiammatoria che appartiene alla famiglia delle chemochine ed è responsabile della chemotassi dei neutrofili, ma anche di monociti, linfociti, basofili ed eosinofili nei tessuti infiammati per 24 ore. IL-

8 stimola l'espressione di molecole d'adesione sulle superfici cellulari, perciò potenzia l'adesione dei PMN all'endotelio e la diapedesi attraverso la parete vasale. IL-8 è prodotta da macrofagi, cellule T attivate dall'antigene, cellule epiteliali ed endoteliali e neutrofili. IL-6 è una citochina proinfiammatoria, ma ha un ruolo protettivo perché fa decrescere i PMN e favorisce il reclutamento dei monociti portando verso la risoluzione dell'infiammazione e l'inizio della risposta immunitaria. IL-10 è antinfiammatoria, impedisce ai monociti di produrre IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (Kaplanski *et al.* 2003).

Gli steroidi ovarici controllano l'espressione delle citochine nell'endometrio (Kelly *et al.*, 2001). I livelli basali di IL-8 e IL-10 nella cavalla sono più elevati durante l'estro rispetto al diestro (Fumuso *et al.*, 2007). L'infusione intrauterina di PBS, SP, *skim milk extender* o *egg yolk extender*, fa aumentare l'espressione di IL-1 β , IL-6 e TNF- α in biopsie endometriali di cavalle a 12 ore dall'infusione (Palm *et al.*, 2008). Un aumento transitorio di citochine proinfiammatorie (IL-1, IFN- γ , TNF- α , IL-8) si osserva 2 ore e 6 ore dopo AI nelle fattrici (Troedsson e Woodward, 2012). Citochine modulatrici, antagonisti del recettore IL-1 (IL-1RN) e IL-10 presentano un picco a 6 ore e l'espressione è più elevata nelle cavalle resistenti che nelle suscettibili (Troedsson e Woodward, 2012). Fumuso *et al.* (2007) eseguirono biopsie endometriali a 24 ore dall'AI e trovarono che IL-8 era più elevata nelle cavalle suscettibili, ma non riscontrarono differenze per quanto riguarda IL-10 (Fumuso *et al.*, 2007). Facendo un confronto con lo studio di Troedsson e Woodward (2012), è probabile che il momento scelto da Fumuso per il prelievo dei campioni fosse troppo ritardato e che a 24 ore il picco fosse già passato.

2.3 POSSIBILI IMPLICAZIONI PER L'INSTAURARSI DELLA GRAVIDANZA

La maggior caratteristica dell' infiammazione acuta è la leucocitosi neutrofilica, ma dopo 24–48 ore, predominano i monociti. IL-6 regola questa transizione (Kaplanski *et al.*, 2003).

I PMN rappresentano la prima linea di difesa e muoiono nei tessuti, i macrofagi appartengono alla seconda linea di difesa e vivono a lungo. PMN e macrofagi sono entrambe cellule fagocitarie, ma i macrofagi hanno anche la funzione di processare gli antigeni e di presentarli alle cellule immunitarie. I macrofagi e le cellule dendritiche hanno entrambe questa funzione e trasportano gli antigeni seminali ai linfonodi dove attivano la risposta immunitaria verso il complesso maggiore di istocompatibilità di origine paterna e verso altri antigeni. La risposta immunitaria del tratto genitale femminile verso il seme risulta in una funzionale immunotolleranza verso gli antigeni presenti nel seme. I Macrofagi inoltre rimodellano l' endometrio per l' impianto, regolano l' angiogenesi e promuovono la proliferazione epiteliale (Tizard, 1996).

Nella scrofa il numero di macrofagi sulla superficie epiteliale è solo di poco maggiore 6 ore dopo IA rispetto alle scrofe non inseminate. Ma a 19 giorni il numero è significativamente più alto nelle scrofe gravide che nelle vuote (Kaeoket *et al.*, 2003).

C' è un precoce (6 ore dopo AI) reclutamento di cellule CD4 nell' endometrio equino. Queste cellule sono significativamente aumentate nel corpo dell'utero 6 e 48 ore dopo IA, ma non nelle corna uterine. Le CD8⁺ tendono crescere nelle corna uterine 6 ore dopo AI ma non 48 ore dopo (Tunon *et al.*, 2000).

La fase iniziale dell'infiammazione post-coitale ha ricevuto da sempre molta più attenzione rispetto agli eventi più tardivi. Conosciamo molto di più dei PMN che dei macrofagi e delle cellule T. Questi non sono coinvolti nell' interazione con le cellule spermatiche, ma hanno importanti funzioni nello sviluppo dell' immunotolleranza e nella preparazione dell' endometrio ad accettare l' embrione (Katila, 2012).

Gli spermatozoi, ma in particolare le proteine del PS interagiscono con l' epitelio uterino inducendo una serie di cambiamenti nella risposta immunitaria. PS contiene molecole immunoregolatrici, ma innesca anche il rilascio di citochine proinfiammatorie da parte dei leucociti e la loro espressione nell' endometrio. Le citochine attirano i monociti e le cellule dendritiche e influenzano la differenziazione dei macrofagi (Robertson, 2007).

Le reazioni di tipo pro-infiammatorio mutano ad antinfiammatorie e ad uno stato regolatorio. Per esempio il fattore di crescita TGF β prodotto dalle cellule T attivate inibisce la proliferazione e la differenziazione di cellule T *helper* e citotossiche. Questo controlla la risposta immunitaria e mantiene l' omeostasi immunitaria (Rubstov e Rudensky, 2007).

Per finire, in alcune specie le cellule immunitarie facilitano l'impianto le prime fasi dello sviluppo placentare e il mantenimento della gravidanza. Queste cellule sono coinvolte anche nel rimodellamento tissutale e nell' angiogenesi (Schuberth *et al.*, 2008).

Nei roditori il SP favorisce non solo la sopravvivenza degli spermatozoi, ma anche la recettività del tratto genitale femminile e lo sviluppo embrionale. In assenza di SP, criceti mostrano un minor numero di embrioni pre impianto e una mortalità fetale più elevata (O *et al.*, 1988).

Nei suini, la stimolazione del tratto genitale femminile da parte del SP non è essenziale, ma è stato evidenziato che un pre-trattamento con PS o seme ucciso al calore risulta in un maggior percentuale di parti e in nidiate più numerose (Flowers e Esbenshade, 1993).

Transforming growth factor- β abbonda nel PS del verro ed è correlato alla concentrazione di spermatozoi, ma non al tasso di concepimento. TGF- β induce la differenziazione delle cellule T *suppressor* e potrebbe essere un segnale tra maschio e femmina coinvolto nei cambiamenti immunitari che avvengono nel tratto riproduttivo femminile nei suini (O'Leary *et al.*, 2004, 2011). Un altro studio però mostra che TGF- β 1 somministrato al momento dell' IA non migliora il tasso di concepimento nelle scrofe (Rhodes *et al.*, 2006). Ulteriori studi sono necessari per stabilire il ruolo del TGF- β negli animali domestici.

GM-CSF, IL-6 e *Leukaemia inhibitory factor* sono indotti dal seme e sono embriotrofici (Robertson, 2007). Nella donna la ridotta espressione di IL-6 e IL-1 α nella fase secretoria dell' endometrio è associata ad aborto ricorrente (Jasper *et al.*, 2007).

È molto probabile che anche negli animali domestici l' infiammazione post-coitale e gli eventi immunologici conseguenti giochino un ruolo importante nello sviluppo dell' immunotolleranza verso gli antigeni paterni ed embrionali e nel conseguente sviluppo embrionale. Fino ad oggi non ci sono sufficienti studi per confermare questa ipotesi, ma questa area di ricerca potrebbe essere molto importante per comprendere meglio la fisiologia delle prime fasi della gravidanza e del suo mantenimento.

2.4 EFFETTI A LIVELLO DEGLI ORMONI OVARICI

Le attività associate all' infiammazione uterina non sono limitate all'utero ma si estendono alle ovaie. Nei suini il tempo che intercorre tra il picco di LH e l' ovulazione viene accorciato dopo l' accoppiamento naturale (Signoret *et al.*, 1972) e dopo l' infusione transcervicale di PS (Waberski *et al.*, 1997). Questi effetti si riscontrano solo nell' ovaio ipsilaterale e sembrano condotti localmente attraverso un sistema vascolare controcorrente che unisce utero e ovaie (Waberski *et al.*, 1999).

È stato dimostrato che il PS influenza lo sviluppo del corpo luteo e la sua capacità steroidogenica. Nel topo, l'esposizione al PS incrementa il numero di leucociti ovarici (Gangnuss *et al.*, 2004) In scrofe trattate con PS i leucociti, soprattutto i macrofagi, aumentano nei tessuti ovarici a 34 ore. Inoltre i pesi dei corpi lutei e la concentrazione plasmatica di progesterone aumentano tra il quinto e il nono giorno dopo il trattamento. Si suppone che il PS faccia aumentare la trascrizione dell' mRNA codificante per la cicloossigenasi-2 (COX-2), che induce la sintesi uterina di PGE e PGF2 α . Queste raggiungono l'ovaio tramite un sistema controcorrente e promuovono l' ovulazione e lo sviluppo del corpo luteo (O' Leary *et al.*, 2006; Robertson, 2007).

3 LA CLEARANCE UTERINA

Un eccessivo accumulo di fluido intrauterino può risultare da un aumento della produzione di secrezioni (Reilas et al., 1997; Ötzgen et al., 2002), o da un aumento del trasudato (Tunón et al., 1998). Fluidi possono accumularsi nel lume uterino durante l' estro se non vengono correttamente drenati attraverso la cervice, la produzione di fluidi può aumentare in seguito a infiammazione cronica o in corso di reflusso urinario nell'utero. Alterazioni degenerative uterine come l' elastosi vascolare possono contribuire all' accumulo di fluidi. L' elastosi vascolare sembra ridurre la fertilità indirettamente, attraverso la riduzione della perfusione endometriale e disturbi nel drenaggio uterino causati dal ridotto ritorno venoso (Schoon et al., 1999; Esteller-Vico et al., 2007; Liu et al. 2008). Le cavalle possono avere un' aumentata secrezione ghiandolare ad esempio in conseguenza di un' irritazione cronica. Le cavalle con piometra o endometrite purulenta mostrano un'uniforme dilatazione ghiandolare che potrebbe significare aumentata secrezione. Un accumulo di fluidi intrauterini In diestro indica un processo infiammatorio con effetti negativi sulla gravidanza (Adams et al., 1987). Comunque il fattore riconosciuto come principale responsabile dell' accumulo di fluidi è la una ritardata *clearance* uterina (*delayed uterine clearance* o DUC)(Le Blanc et al., 1994b; Troedsson, 1999).

La DUC è causata da molteplici fattori:

- Attività del miometrio ridotta in frequenza ampiezza e durata (Troedsson, 1993).
- Alterazioni vascolari dell'endometrio (Troedsson, 1999) e alterato drenaggio linfatico (Causey, 2006).
- Alterata risposta ormonale (Troedsson, 1999).
- Alterata produzione di muco (Card, 2005; Causey, 2006).

- Alterati rapporti anatomici, in particolare nelle fattrici multipare, dovuti ad una parziale dilatazione dell'utero (Troedsson, 1999) o ad una ventroflexione dell'utero (Le Blanc *et al.*, 1998).
- Incapacità della cervice a dilatarsi durante l'estro (Hurtgen, 2006)

Inoltre l'alterazione delle barriere fisiche (cervice, vestibolo e vulva), in seguito a lesioni da parto o la cattiva conformazione del perineo conseguente a lesioni da parto o eccessiva magrezza possono contribuire alla contaminazione uterina e quindi al persistere dell'infezione, poiché permettono l'entrata nell'utero di aria, feci, urine (Hurtgen, 2006).

3.1 LA CONTRATTILITA' DEL MIOMETRIO

Attualmente si ritiene che le deficienze del drenaggio meccanico abbiano un grande impatto sulla suscettibilità della fattrice alle infezioni. I contenuti uterini vengono rimossi principalmente attraverso due vie: la via linfatica e il drenaggio attraverso la cervice e la vagina. Le efficienti contrazioni uterine sono necessarie per entrambi (Katila, 2008).

Il miometrio è formato da cellule muscolari lisce distribuite su due strati: uno interno circolare ed uno esterno longitudinale. Si pensa che alla base dell'accesa suscettibilità all'endometrite post coitale persistente vi sia un difetto contrattile del miometrio (Nikolakopoulos and Watson, 1999; Rigby *et al.*, 2001). Troedsson *et al.* (1993) mostrarono che l'attività elettrica del miometrio, misurata 20 ore dopo un'inoculo batterico, aumenta sia nelle cavalle resistenti che nelle suscettibili, tuttavia le prime mostrano un'attività maggiore in frequenza, intensità e durata rispetto alle altre.

La contrattilità miometriale è stata valutata in vitro misurando la tensione isometrica generata dagli strati circolare e longitudinale in risposta a cloruro di potassio (KCl), ossitocina e prostaglandina-2 α (PGF2 α). Non è stato osservato un declino dipendente dall'età, ma il miometrio di cavalle con DUC generano una minor tensione delle cavalle resistenti per ogni sostanza testata. Fu concluso che le cavalle con DUC

hanno un difetto contrattile intrinseco nelle cellule endometriali che non è collegato a una riduzione della concentrazione intracellulare di calcio o alla mediazione dei recettori (Rigby *et al.*, 2001). Un' aumentata deposizione di collagene è un reperto comune nelle cavalle anziane (Kenney e Doig, 1986), questo potrebbe irrigidire la matrice extracellulare del miometrio e decrescerne la forza contrattile (Rigby *et al.*, 2001).

È stato proposto che le cavalle anziane e con un elevato numero di parti potrebbero avere un pattern anormale di contrattilità a causa dello stiramento prolungato e ripetuto del miometrio e delle terminazioni nervose contenute nel muscolo, durante la gravidanza. La somministrazione di detomidina (un α -2 agonista) prima dell' iniezione di ossitocina, confrontata con la somministrazione di soluzione salina e ossitocina, fa aumentare il numero di contrazioni uterine e la massima pressione intrauterina nel corno uterino di cavalle normali, ma non in quelle con ridotta *clearance*. Ciò potrebbe essere dovuto ad una diminuzione del numero o della risposta dei recettori α -adrenergici dovuto ad un difetto della trasmissione del segnale nel miometrio. Non si conosce perché gli α -2 agonisti facciano aumentare la risposta all' ossitocina. Forse la detomidina stimola i neuroni che promuovono la risposta del miometrio all' ossitocina, o la via attivata dalla detomidina potrebbe potenziare la traduzione del segnale indotta dall' ossitocina. Esiste anche una diversa localizzazione della regione *pacemaker* nelle cavalle normali n confronto a quelle con DUC. Nelle cavalle normali questa regione si trova nel corno uterino e causa contrazioni che si propagano dal corno verso la cervice. Nelle cavale con DUC, la regione *pacemaker* è più frequentemente localizzata nel corpo uterino. Questo difetto può essere intrinseco o può essersi sviluppato in seguito allo stiramento e all' ipertrofia dovute alle ripetute gravidanze (Von Reitzenstein *et al.*, 2002).

L' importanza del ruolo della contrattilità per la *clearance* uterina è stato dimostrato da Nikolakopoulos e Watson (1999). Essi ridussero le contrazioni mediante un trattamento con clenbuterolo e infusero batteri nell' utero di cavalle resistenti in fase estrale. Nonostante la maggior parte delle cavalle fosse in grado di eliminare i batteri, tutte accumularono fluidi,

mentre non li avevano accumulati durante il ciclo di controllo (Nilkolakopoulos e Watson, 1999). L'importanza delle contrazioni uterine nella rimozione dei fluidi e dei PMN è stata dimostrata in un altro esperimento con fattrici controllo, fattrici trattate con ossitocina e fattrici trattate con flunixin meglumine. Otto ore dopo l'inseminazione artificiale, il gruppo trattato con ossitocina mostrava pochissimo fluido intrauterino e PMN, mentre il gruppo trattato con flunixin meglumine mostrava una quantità maggiore di fluidi e PMN. A 25 ore, il gruppo trattato con ossitocina non aveva quasi più nessun fluido o PMN mentre l'altro gruppo e il gruppo controllo non differivano molto tra loro (Reilas et al., 2006).

È stato dimostrato che l'inseminazione causa un rilascio di ossitocina simile nelle cavalle suscettibili e resistenti, ma il rilascio di PGF2 α è significativamente maggiore nelle resistenti per i primi 30 minuti dopo l'IA. Similmente la somministrazione esogena di ossitocina induce un maggior rilascio di PGF2 α nelle cavalle resistenti rispetto alle suscettibili. Questo potrebbe suggerire un difetto nel rilascio di PGF2 α a livello del recettore per l'ossitocina o a livello post-recettoriale. La riduzione della produzione di PGF2 α da parte del miometrio stimolato dall'ossitocina potrebbe contribuire alla ridotta risposta contrattile osservata nelle cavalle suscettibili (Nilkolakopoulos *et al.*, 2000). D'altro canto Le Blanc *et al.*, (1994a) hanno dimostrato l'efficacia dell'ossitocina nel potenziare la *clearance* di radiocolloide sia nelle fattrici suscettibili che nelle resistenti. In un altro esperimento le cavalle sono state trattate con ossitocina o con fenilbutazone (un inibitore delle prostaglandine) o con entrambi (fenilbutazone 3.5 ore prima dell'ossitocina) e la *clearance* uterina del radiocolloide è stata misurata mediante scintigrafia. Il fenilbutazone da solo inibisce il rilascio di prostaglandine e la *clearance* uterina del radiocolloide ma, a dispetto di ciò, non è in grado di impedire la *clearance* promossa dall'effetto dell'ossitocina (Cadario et al. 1995). L'autore ne conclude che l'ossitocina potrebbe avere un effetto diretto nella cavalla. Ovviamente sono necessari ulteriori studi per meglio definire la relazione tra prostaglandine ed ossitocina nella cavalla.

Iniezioni di ossitocina facilitano il drenaggio uterino in cavalle suscettibili (Allen, 1991) e sono di uso comune nella pratica. Le scoperte di Nikolakopoulos e dei suoi collaboratori potrebbero avere delle conseguenze pratiche: forse alcune cavalle problema potrebbero rispondere meglio al trattamento con prostaglandine rispetto al trattamento con ossitocina. Tuttavia Sharpe et al. (1988) hanno riportato che la PGF₂ α non ha un effetto uterotonico nella cavalla.

3.2 IL DRENAGGIO LINFATICO

Nella cavalla i vasi linfatici e i linfonodi drenano il lume e la sottomucosa uterina dall'eccesso di fluidi (Le Blanc et al., 1995). Le contrazioni ritmiche della muscolatura pompano i fluidi nei vasi linfatici. L'efficacia e la velocità del drenaggio sono minori nelle cavalle suscettibili rispetto alle resistenti. Se l'utero non viene ripulito prima che la cervice si chiuda, i vasi linfatici drenano i contenuti uterini nelle cavalle normali. Nelle cavalle suscettibili, i sottoprodotti infiammatori rimangono nel lume uterino aumentando l'infiammazione e l'irritazione dell'endometrio (Le Blanc et al., 1995). Gli studi di Reilas et al. (1997) non riuscirono a dimostrare un'associazione tra l'accumulo di fluidi e le lacune linfatiche in campioni biopsici, ma la fibrosi era maggiore nelle cavalle con accumulo di fluidi. Anche Özgen et al. (2002) scoprirono che la fibrosi perigliandolare è più frequente nelle cavalle con accumulo intrauterino di fluidi e Le Blanc et al. (1994) hanno suggerito che la fibrosi endometriale possa bloccare il drenaggio uterino attraverso i vasi linfatici.

3.3 IL RUOLO DELLA CERVICE

La necessità di una cervice funzionante fu scoperta presto (Evans et al., 1986) e confermata più tardi da studi scintigrafici (Le Blanc et al., 1994b). Essi dimostrarono che le cavalle suscettibili hanno maggiori probabilità di ritenere radiocolloidi all'interno dell'utero rispetto alle

resistenti durante l' estro o nelle 48 ore seguenti l' ovulazione. Tuttavia alcune cavalle nullipare non riescono ad eliminare il radiocolloide, né ci riescono le cavalle normali in diestro. Questi studiosi ne conclusero che una scarsa dilatazione della cervice può ridurre la *clearance* uterina. L' importanza nella pratica clinica di una cervice funzionante fu riconosciuta da Pycock (in Allen 1993); cavalle con accumulo di fluidi intrauterini spesso hanno una cervice anormale. L' incapacità della cervice a dilatarsi avviene spesso nelle cavalle anziane che non sono mai state accoppiate. La dilatazione manuale della cervice è utilizzata per favorire l'evacuazione dei fluidi (Pycock in Allen, 1993; Pycock e Newcombe, 1996).

3.3.1 ANATOMIA E ISTOLOGIA

La cervice equina è una struttura cilindrica relativamente semplice, senza anelli trasversali. La lunghezza normale è compresa tra i 5 e i 7 cm e la larghezza tra i 3 e i 4 cm (Tibary, 2011). Le pieghe longitudinali endometriali si continuano a livello della cervice facilitando il drenaggio uterino. La cervice equina può essere dilatata manualmente in ogni fase del ciclo riproduttivo. La porzione più caudale protrude nella vagina come porzione vaginale e può essere visualizzata durante l' esame vaginoscopico. Le pieghe continuano nella vagina come frenulo ventrale e dorsale (Ginther, 1992). La tonaca muscolare è formata da due strati di muscolatura liscia, uno strato circolare interno ed uno longitudinale esterno, che si continuano nella muscolatura di utero e vagina (Sertich 2011). Uno strato di muscolatura circolare ispessito forma il corpo della porzione vaginale.

Il canale cervicale della cavalla è rivestito da un epitelio batiprismatico semplice. La tunica mucosa forma pieghe primarie, secondarie e terziarie. Le cellule epiteliali sono suddivise in due tipologie: *goblet cells* non kinociliate e cellule kinociliate. (Huchzermeyer et al., 2005). Le cellule *goblet-like* producono mucina e le kinocilia supportano il flusso di muco verso la cervice. Durante l' estro, il muco agisce da lubrificante e durante la gravidanza da sigillante. La lamina propria della mucosa è priva di

ghiandole e contiene vene, venule, arterie e arteriole. Questo insieme di vasi viene definito plesso venoso, similmente a quello presente nella cervice canina. Questa forte vascolarizzazione potrebbe assicurare una rapida reazione immunologica verso i batteri e supportare la chiusura del canale cervicale. Lo spessore dello strato muscolare circolare è ricco in fibre elastiche e garantisce la dilatazione e la contrazione della cervice. (Huchzermeyer et al., 2005).

Nello strato muscolare della cervice equina sono state identificate molte fibre nervose adrenergiche e peptidergiche. Questa elevata innervazione è importante per la risposta della cervice agli stimoli ormonali, la sua chiusura durante il diestro e la gravidanza, e il suo rilassamento durante l'estro e il parto (Bae et al., 2001).

Nella lamina propria della cavalla in diestro sono stati trovati granulociti eosinofili e mastociti. La densità dei due tipi di cellule è maggiore a livello dell'orificio esterno e suggeriscono che gli eosinofili possano far parte dell'immunità locale (Weherend et al., 2005).

Un altro lavoro in cui è stata valutata la densità di mastociti e la correlazione con i livelli di progesterone ed estradiolo-17 β ha dimostrato che la densità dei mastociti è maggiore a livello della cervice rispetto a utero e vagina e in particolare a livello dell'ostio cervicale interno. Essi sono distribuiti specialmente a livello della lamina propria. Inoltre la densità dei mastociti è influenzata in modo significativo dalla presenza di estradiolo-17 β . Dal momento che questo tipo cellulare è coinvolto nel processo infiammatorio, ma anche nei processi di rimodellamento tissutale ed angiogenesi, è stato suggerito che i mastociti, a livello cervicale, non siano solo un mezzo di difesa, ma potrebbero anche essere coinvolti nei cambiamenti strutturali della cervice durante l'estro. L'applicazione locale di estrogeni potrebbe quindi essere un'opzione terapeutica qualora la cervice non riesca a rilassarsi durante l'estro poiché promuoverebbe l'infiltrazione locale di mastociti e favorendo la dilatazione della cervice (Walter et al., 2012).

3.3.2 FISILOGIA

I cambiamenti che avvengono nella cervice sono regolati principalmente da progesterone ed estrogeni: il progesterone ne provoca la chiusura e l'ispessimento mentre gli estrogeni ne provocano l'apertura e la dilatazione. A causa della grande variazione tra una cavalla e l'altra, i livelli di estradiolo-17 e di progesterone non possono essere ben correlati allo stato della cervice. Tuttavia il rapporto estradiolo-17: progesterone è più indicativo ed è maggiore di 5 in estro e minore di 5 in diestro (Waelchli et al., 1994).

Recettori citosolici per gli estrogeni e il progesterone sono stati rilevati anche nella cervice equina, nonostante il loro numero sia molto più basso che a livello uterino (Re et al., 1995).

In molte specie è stato dimostrato che la cervice è immunologicamente competente e può produrre anticorpi in risposta ad antigeni. Le immunoglobuline IgA e IgG sono presenti nel muco e nei tessuti cervicali. Anticorpi verso gli spermatozoi sono stati rinvenuti nel muco cervicale della donna. Nel coniglio l'ectocervice diviene edematosa e viene invasa dai polimorfonucleati 30 min dopo l'inseminazione (Tyler, 1977). La reazione agli spermatozoi non è stata studiata nella cervice equina (Katila, 2012).

I neutrofili si rinvengono normalmente nelle biopsie cervicali e in preparati citologici di cavalle sane (Aguilar et al. 2006). Il 33% delle colture ottenute da tamponi cervicali portano alla crescita degli stessi batteri ottenuti da tamponi vaginali e il 46% producono le stesse specie batteriche dei tamponi uterini (Newcombe, 1978) . Questo dimostra che alcuni ritrovamenti di batteri nella cervice sono reperti normali e che strumenti protetti sono indispensabili per differenziare tra crescita di batteri cervicali e uterini.

3.3.3 VALUTAZIONE DELLA CERVICE

L'esame della cervice comprende la palpazione transrettale, l'ecografia transrettale, la palpazione transvaginale e la vaginoscopia. La palpazione

transrettale viene effettuata di routine, mentre l' ecografia è uno strumento relativamente nuovo per l' esame della cervice (Day et al., 1995; Campbell e Bliss, 2010). L'esame della cervice può essere effettuato per mettere in evidenza processi patologici , ma è anche un ottimo indicatore dello stato ormonale e della fase del ciclo estrale. Durante l' ispezione rettale si valutano le dimensioni e la consistenza della cervice; sotto l'effetto del progesterone essa si presenta allungata e dura, mentre sotto l'influsso degli estrogeni è appiattita e soffice (Greenhoff e Kenney, 1975). Durante l'esame vaginoscopico si può apprezzare la porzione vaginale, il suo colore, grado di edema e di flaccidità che sono influenzati dalle variazioni delle concentrazioni degli steroidi ovarici (Lieux,1970).

L'integrità della parete cervicale è valutata digitalmente: l'indice viene inserito nel canale cervicale e la parete viene palpata tra pollice e indice. Durante la fase luteale la porzione vaginale protrude in vagina ed il canale è così stretto da rendere difficoltoso il passaggio di un dito, mentre nella fase follicolare è possibile inserire nel canale un dito o tre dita e, a volte, l'intera mano (Greenhoff e Kenney, 1975) .

3.3.4 CONDIZIONI PATOLOGICHE

Lo sviluppo di anormalità cervicali nella cavalla è raro ma è stato riportato. Cavalle con anormalità cromosomiche hanno generalmente una cervice sottosviluppata e aperta a causa della carenza di stimoli ormonali (Hurgten, 2011). Sono state riportate anche la completa assenza della cervice e l'ipoplasia cervicale (Allen,1981), l'iperplasia (Riera et al., 1989). L'incompleta fusione dei dotti di müller può risultare in un completo o parziale sdoppiamento della cervice; il canale cervicale può anche terminare a fondo cieco. Nella cavalla con cervice doppia, ogni canale cervicale porta in un corno uterino, queste cavalle sono sterili a causa della ridotta mobilità embrionale (Hurgten, 2011).

Lacerazioni cervicali si possono verificare durante la seconda fase del parto. Spesso il parto è spontaneo, ma danni possono essere dovuti anche a manipolazioni in corso di distocia, specialmente durante la

fetotomia. Le lacerazioni possono riguardare solo lo strato muscolare o tutti e tre gli strati, ma in entrambi i casi interferiscono con la funzione cervicale. L'epitelio può formare adesioni transluminali che impediscono la normale dilatazione della cervice e il drenaggio uterino. La lacerazione a livello della porzione vaginale può portare ad una sua adesione con l'epitelio della vagina. Anche sostanze irritanti infuse nell'utero possono causare una grave infiammazione e adesioni transluminali o vaginali. (Sertich, 2011).

Severe adesioni cervicali sono raramente trattabili, la rottura manuale e il trattamento seguente con unguenti a base di corticosteroidi sono le opzioni possibili. Se la porzione vaginale aderisce all'epitelio vaginale può essere necessaria la dissezione chirurgica e l'applicazione di suture retrattili che permettano la manipolazione giornaliera al fine di prevenire la ri-formazione di adesioni. Le lacerazioni vengono corrette chirurgicamente (Sertich, 2011).

3.3.5 DRENAGGIO CERVICALE

L'incapacità della cervice a dilatarsi può essere congenita o acquisita. L'estrema tortuosità della cervice è associata all'incapacità di rilassarsi durante l'estro. Queste fattrici tendono ad accumulare fluidi in utero. Se non trattata questa condizione può portare a piometra. Adesioni cervicali possono essere conseguenti al parto (Katila, 2012).

La fibrosi della cervice dovuta alla perdita di elasticità che probabilmente aumenta con l'età è comune nelle cavalle anziane che non sono mai state accoppiate (Tibary, 2011), ma può essere presente anche in cavalle giovani con problemi di fertilità.

La palpazione della cervice, il lume della quale è appena accessibile da un dito, e la presenza di fluido uterino suggerisce che la cavalla abbia dei problemi cervicali. La dilatazione digitale fino all'ampiezza di uno o due dita è il trattamento preferito (Pycock, 1994). In casi difficili può essere applicato PGE1 (misoprostolo) al canale cervicale (Nie et al., 2003).

L'importanza del ruolo della cervice nel drenaggio uterino è ben conosciuta (LeBlanc *et al.*, 1994). L'occlusione della cervice mediante un catetere intracervicale per 25 ore dopo l'inseminazione risulta in un accumulo intrauterino di fluidi e citochine (IL-6 e TNF- α), in un aumento del numero di neutrofili polimorfonucleati (Liepina *et al.*, 2010). Le differenze tra il gruppo trattato (occlusione con catetere) e il gruppo controllo (senza catetere) sparirono 48 ore dopo la rimozione del catetere. Un reperto inaspettato fu l'effetto cascata: nonostante ci fosse un ciclo non trattato tra i due cicli trattati, durante il secondo ciclo di trattamento (l'occlusione era stata effettuata durante il primo ciclo) il numero di PMNs era dieci volte più elevato che nel controllo durante il primo ciclo di trattamento. Il tasso di concepimento complessivo era di 41,7% nel primo ciclo di trattamento mentre era di 16,7% nel secondo ciclo di trattamento. La ragione di questa aumentata risposta infiammatoria non è conosciuta, ma è importante da ricordare nella pratica clinica perché il fallimento della cervice a dilatarsi può avere conseguenze non solo nell'immediato ma anche nel futuro (Liepina *et al.*, 2010).

3.4 ALTRE ALTERAZIONI ANATOMICHE

Anomalie conformazionali, come pneumovagina, urovagina e lesioni cervicali, facilitano l'entrata di batteri, aria e urina nell'utero. Una piega vestibolovaginale che funzioni in modo corretto è un'importante barriera per le contaminazioni batteriche ascendenti. La fossa clitoridea contiene più batteri di ogni altra parte del tratto riproduttivo della cavalla e può servire da fonte di contaminazione durante l'accoppiamento e le manipolazioni uterine nelle cavalle suscettibili (Hinrichs *et al.* 1988). I fluidi tendono ad accumularsi nel corpo uterino. Altri possibili motivi di accumulo di fluidi oltre alla danneggiata attività miometriale includono la ventroflexione dell'utero (Le Blanc *et al.*, 1998) e la dilatazione ventrale dell'utero. A causa della forza di gravità, i fluidi tendono ad accumularsi nella dilatazione ventrale dell'utero (Knudsen, 1964). La dilatazione

ventrale e la ventroflexione dell' utero sono problemi tipici di cavalle anziane e pluripare.

3.5 IL MUCO

L'utero dipende fortemente dal meccanismo fisico della clearance che è basato sul sistema mucociliare e sulla contrattilità (Causey, 2007). Lo squilibrio o il venir meno di questi due meccanismi accresce il rischio di endometrite post coitale persistente (Troedsson, 1999).

Variazioni nella produzione, elasticità e viscosità del muco endometriale può interferire con l'abilità dell' apparato mucociliare nel rimuovere il materiale particolato, con la migrazione degli spermatozoi nell' ovidotto e con la penetrazione degli antibiotici nell' endometrio (LeBlanc, 2010).

L'endometrio equino è formato da cellule ciliate secernenti muco. Le cilia battono tredici volte al secondo e aiutano a trasportare muco, fluidi, batteri e altri detriti lungo le pieghe longitudinali di endometrio e cervice (Causey, 2007).

Tuttavia spazi capillari tra le pieghe e pieghe atrofiche o danneggiate disturbano questo meccanismo. Ulcerazioni, degenerazione e mancanza di ciglia potrebbero avere il medesimo effetto. Il muco ricopre, idrata e lubrifica l'endometrio (Lagow *et al.*, 1999) e previene il legame dei batteri con i recettori cellulari. (Lagow *et al.*, 1999; Causey,2006).

Il muco contiene acqua, ioni e specifiche proteine antibatteriche quali lattoferrina, lisozima ed immunoglobuline, la principale componente del muco è data da mucine, glicoproteine altamente idratate (Wiggins *et al.*, 2001). Si pensa che l' alterazione dello stato di idratazione di questi polisaccaridi possa portare ad un alterata viscosità ed elasticità del muco (Causey, 2007). Di conseguenza i patogeni intrappolati nel muco e i fluidi non possono essere eliminati correttamente (Wiggins *et al.*, 2001; Causey, 2007).

3.6 LE INFLUENZE ORMONALI: EFFETTI DEGLI STEROIDI OVARICI

Il lume uterino è un ambiente dinamico, infatti la composizione dei fluidi in esso contenuti in base alle fasi del ciclo estrale. La secrezione e il rilascio di enzimi e proteine è regolata dagli steroidi ovarici. L'utero normale contiene piccole quantità di fluidi che vengono prodotti localmente dalle ghiandole uterine e rappresentano un trasudato del sangue. La presenza di un accumulo di fluido intrauterino durante l'estro può cambiare di giorno in giorno ed è associato a modificazioni della composizione delle secrezioni uterine (Reilas *et al.*, 1997). Le cellule dell'epitelio uterino di cavalle trattate con estradiolo dimostrano *in vitro* una minor adesione da parte dei batteri rispetto alle cellule prelevate da cavalle trattate con progesterone (Watson *et al.*, 1988). La presenza di muco nel lume uterino durante l'estro può inibire l'aderenza batterica in modo meccanico.

È comunemente accettato che le cavalle siano maggiormente predisposte alle infezioni sotto l'influsso del progesterone piuttosto che degli estrogeni o in assenza di influssi ormonali. Trattamenti con progesterone possono portare una cavalla considerata resistente a diventare suscettibile ad un'aggressione batterica. (Evans *et al.*, 1986; Reilas *et al.*, 1998). Nonostante ci sia evidenza degli effetti avversi del progesterone e degli effetti benefici degli estrogeni sulla funzione dei PMNs (Washburn *et al.*, 1982; Watson *et al.*, 1987c), gli effetti del drenaggio fisico uterino sono ancora più ovvi: sotto l'influenza del progesterone la cervice è chiusa, mentre sotto la dominanza degli estrogeni rimane aperta. Questo ha un forte impatto sulla resistenza alle infezioni uterine: il progesterone inibisce il drenaggio uterino mantenendo la cervice chiusa (Evans *et al.*, 1986).

Gli steroidi ovarici regolano anche la contrattilità uterina. Elevati livelli di progesterone mantengono l'utero in uno stato di inerzia, mentre un calo della concentrazione di progesterone ed un aumento degli estrogeni

stimolano la contrattilità. Gli estrogeni inducono la formazione di *gap junctions*, aumentano la produzione di prostaglandine e potenziano l'espressione di recettori per l'ossitocina nella muscolatura liscia. L'ossitocina stimola le contrazioni uterine e il rilascio di acido arachidonico e quindi la formazione di PGF2 α . La PGF2 α potenzia le contrazioni uterine causando depolarizzazione di membrana e aumentando il numero di *gap junctions* (Jain *et al.*, 1999).

3.7 ETA' E NUMERO DI PARTI

Il 17 % della cavalle tra i 3 e i 9 anni mostrava accumulo di fluido intrauterino dopo inseminazione con seme congelato, rispetto al 28% delle fattrici tra i 10 e i 16 anni e al 68% di quelle che avevano superato i sedici anni d'età (Barbacini *et al.*, 2003). Un altro lavoro, al contrario, non rilevò differenze tra l'accumulo di fluidi in cavalle giovani rispetto alle anziane dopo inseminazione con seme congelato (Guevenc, 2004). Le cavalle con problemi di fertilità generalmente mostrano maggior accumulo di fluidi (38%) rispetto a quelle che non sono mai state accoppiate prima (19.7%) o a quelle che hanno partorito (17,8%) (Barbacini *et al.*, 2003). Quindi sembra che l'età della cavalla e il suo stato riproduttivo giochino un ruolo importante nell'accumulo di fluidi intrauterini che può seguire l'accoppiamento.

Il numero di parti e la degenerazione endometriale influenzano in modo significativo l'elastosi vascolare, questa degenerazione dei vasi uterini potrebbe compromettere la perfusione e potrebbe quindi interferire con le normali funzioni uterine quali il trasporto degli spermatozoi, lo sviluppo embrionale e la risoluzione dell'endometrite post coitale, probabilmente tramite il danneggiamento della contrattilità miometriale (Esteller-Vico *et al.*, 2012).

Inoltre le cavalle anziane hanno una maggior rilassatezza dei tessuti e presentano più facilmente alterazioni anatomiche a livello perineale od

uterino, come un utero pendulo, che favoriscono la persistenza dell'inflammazione.

4 IL RUOLO DEGLI AGENTI INFETTIVI

L'endometrite infettiva cronica insorge qualora la *clearance* uterina risulti difettosa o in seguito ad una contaminazione batterica eccessiva e continua come accade ad esempio nelle cavalle con pneumovagina (Brinsko et al., 2011). Le endometriti infettive possono essere sia sintomatiche che non sintomatiche ma in ogni caso hanno un grande impatto sulla fertilità, infatti si ritrovano nel 25-60 % delle cavalle infertili. (LeBlanc M.M. e RC Causey, 2009).

Differenti batteri esprimono diversi fattori di virulenza e possiedono modi diversi di evadere il sistema immunitario. Questo risulta in una lista di segni clinici e reperti ecografici e di laboratorio. Alcuni batteri come *Escherichia Coli* aderiscono tenacemente alla superficie epiteliale, impedendo la rimozione meccanica. Altri come *Streptococcus* stimolano la produzione di essudato infiammatorio interferendo con la fagocitosi neutrofilica. *Pseudomonas aeruginosa* ed alcuni lieviti e funghi secernono biofilm: una matrice adesiva che supporta la crescita ed il mantenimento di microcolonie batteriche. Il biofilm procura una innata resistenza agli antibiotici e sia la risposta immunitaria umorale che quella cellulare esitano in una infezione cronica persistente, anche dopo molti trattamenti antibiotici (Costerton *et al.*, 1995; Donlan e Costerton, 2002; Otto, 2006). Alcuni batteri e funghi formano placche locali che non vengono rilevate dai tamponi e dalle colture uterine eseguite di routine, mentre altri non producono fluidi intrauterini, il marchio di fabbrica dell'endometrite (LeBlanc, 2010). La stessa risposta uterina ai patogeni può contribuire allo stabilirsi di un' infezione cronica. Durante l' endometrite acuta e subacuta, il muco prodotto dalle cellule epiteliali che ricopre l' endometrio (Le Blanc et al., 2007; Causey, 2007) aumenta; nell'endometrio cronicamente infiammato invece, aree di endometrio perdono muco ed epitelio fornendo maggior opportunità di adesione ai batteri (Causey et al., 2008).

4.1 EZIOPATOGENESI DELL' ENDOMETRITE INFETTIVA CRONICA

La maggior parte dei patogeni coinvolti nell'endometrite infettiva cronica sono commensali od opportunisti. I più frequenti sono: *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia Coli* e varie specie di Staphylococchi (Pycock, 2009).

Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus (S. zoo) è il più comune patogeno isolato dall'utero nella cavalla (Nielsen, 2005; Riddle et al., 2007) e uno studio retrospettivo che valuta la fertilità le cavalle con S. zoo avevano la fertilità più bassa osservata (Riddle et al., 2007).

. Altri patogeni sono trasmessi per via venerea: *Taylorella equigenitalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Raramente si possono rinvenire germi anaerobi tra i quali il più comune è *bacteroides fragilis* Le infezioni fungine sono meno comuni delle batteriche e i più coinvolti sono i lieviti. La specie più frequentemente coinvolta è *Candida Albicans* (Pycock, 2009).

In ogni caso, siccome la maggior parte degli organismi coinvolti sono commensali od opportunisti, la causa principale, anche in questo caso potrebbe essere dovuto ad una ridotta clearance. Anche l' accumulo di fluidi precedente l'inseminazione potrebbe avere un ruolo, poiché, nonostante sia generalmente sterile, potrebbe fornire un mezzo per la crescita dei batteri (Pycock, 2009).

4.2 BIOFILM

Il fallimento dei trattamenti antibiotici nell' endometrite cronica potrebbe essere dovuto alla produzione di biofilm da parte di alcuni batteri gram-negativi, lieviti e funghi. Il biofilm batterico consiste in una comunità eterogenea di specie batteriche, circondate da una matrice extracellulare che coesistono in una relazione simbiotica (Walker, 2008). Nel corpo umano questo biofilm è stato riscontrato nella cavità orale, sulla pelle, nell' intestino e nella vagina. Nella maggior parte dei casi è considerato parte

della normale flora microbica e serve a proteggere dalla colonizzazione di microrganismi patogeni e opportunisti. Quando l' equilibrio di questa comunità di microrganismi viene alterato o distrutto, i patogeni possono colonizzare le mucose, proliferare e causare patologie (Walker, 2008). Il biofilm conferisce antibiotico resistenza e quindi contribuisce al fallimento della terapia. Sono state elaborate diverse teorie per spiegare quest' aumentata resistenza:

- L' antibiotico non è in grado di penetrare la matrice extracellulare del biofilm.
- Gli antibiotici sono meno attivi sul biofilm a causa della lentezza del metabolismo e della crescita dei microrganismi in esso presenti.
- Nel biofilm esiste una piccola sottopopolazione di cellule essenzialmente invulnerabili, le "*persister cells*", che non crescono né muoiono in presenza di un agente battericida e sono multiresistenti verso gli antibiotici.

(Donlan e Consterton, 2002; Soto *et al.*, 2006; Walker, 2008).

Pseudomonas aeruginosa è un forte produttore di biofilm ed è spesso isolato dall' utero di cavalle con endometrite cronica. Altri microrganismi patogeni produttori di biofilm e isolati dall' utero includono: *Staphylococcus epidermis*, *E. coli*, *E. cloacae* e vari funghi e lieviti. Questi organismi causano più comunemente endometrite in cavalle anziane, multipare e sterili che presentano difetti anatomici piuttosto che in fattrici giovani e fertili, tuttavia anche queste ultime possono contrarre infezioni croniche specialmente quando le loro difese uterine vengono compromesse. Le infezioni di questi microrganismi sono difficili da trattare e spesso non rispondono ad un trattamento antibiotico di 3-5 giorni, ciò può risultare in una elevata resistenza verso le sostanze usate inizialmente.

5 RICONOSCERE LE FATTRICI SUSCETTIBILI : DIAGNOSI

5.1 DEFINIZIONE DI SUSCETTIBILITÀ

Il fatto che alcune cavalle siano più suscettibili di altre alle infezioni uterine è stato dimostrato con convinzione da anni (Hughes e Loy, 1969, Peterson *et al.*, 1969). Le cavalle predisposte alle infezioni permanenti sono di solito anziane, con anamnesi di sterilità o di segni clinici di endometrite e appartengono alle categorie biotiche III o IIB (Kenny e Doig, 1986). Tuttavia queste cavalle non possono essere classificate suscettibili sulla base di queste categorie. Una buona anamnesi è un criterio più specifico e sensibile delle biopsie endometriali (Williamson *et al.*, 1989). Troedsson (1991) definì la resistenza come l'abilità di alcune cavalle di eliminare da sole un'infezione batterica indotta sperimentalmente entro 96 ore. Le Blanc *et al.* (1994b) utilizzarono un altro test per differenziare cavalle con una normale *clearance* uterina da quelle con DUC: infusero carbone nell'utero durante l'estro, e se non venivano rilevate tracce di carbone dopo 48 ore la cavalla era considerata resistente. Nessuno di questi test è applicabile nella pratica, ma l'ultrasonografia può essere un mezzo pratico. Brinsko *et al.* (2003), valutarono cavalle suscettibili dopo l'inseminazione ecograficamente, mediante coltura uterina e clearance del radocolloide e rilevarono che la presenza di fluido intrauterino maggiore di 2 cm suggerisce che la fattrice sia suscettibile. Questo strumento può essere utilizzato come una linea guida nella pratica clinica, ma non è un indicatore specifico di suscettibilità. La mancanza di criteri univoci nella definizione di cavalla suscettibile rende difficile l'interpretazione delle sperimentazioni. È possibile che in molti progetti di ricerca le cavalle "suscettibili" non siano state correttamente identificate. Per questa ragione spesso sono stati formati gruppi eterogenei di cavalle "suscettibili" e "resistenti". Questo, aggiunto al numero esiguo di cavalle utilizzate nelle sperimentazioni, a causa della difficoltà del reclutamento di cavalle suscettibili, ha portato a risultati conflittuali e inconsistenti (Katila, 2008).

5.1.1 IMMUNITÀ UMORALE E CELLULARE

L'endometrio equino ha la potenzialità di sintetizzare localmente immunoglobuline. In passato, la credenza che le cavalle suscettibili non avessero sufficienti IgA portò all' utilizzo del colostro come fonte di immunoglobuline per il trattamento dell' endometrite. Più tardi venne riportato che le cavalle che non sono capaci di eliminare i batteri dopo l' inoculazione hanno in realtà una concentrazione di anticorpi nelle secrezioni uterine maggiore rispetto alle cavalle resistenti (Asbury *et al.*, 1980). Nonostante le immunoglobuline siano un componente essenziale di difesa, la suscettibilità alle infezioni uterine non deriva dalla mancanza di immunoglobuline.

Le prime documentazioni sull' opsonizzazione nell' utero delle cavalle dimostrarono che le cavalle suscettibili erano carenti in opsonine nei fluidi uterini e che l' aggiunta di siero ai fluidi di lavaggio uterino potenziavano l' opsonizzazione dei batteri *in vitro* (Asbury *et al.*, 1984). Questo risultò nell' utilizzo di plasma terapia con infusioni intrauterine di plasma che fu praticata per qualche tempo (Asbury, 1984). Studi successivi dimostrarono che in realtà le cavalle suscettibili possedevano nei fluidi uterini un' attività emolitica del complemento maggiore delle resistenti (Watson *et al.*, 1987b). Ciò è comprensibile se si pensa alla natura persistente dell' infiammazione in queste cavalle. Nessuna opsonina è ritrovata prima dell' infezione uterina, ma dopo l' inoculazione batterica esse si accumulano nel lume uterino (Brown *et al.*, 1985). Il rilascio di opsonine (complemento e anticorpi) è un' importante componente della difesa uterina, ma la suscettibilità delle cavalle alle infezioni uterine non dipende da una inefficace opsonizzazione.

Il complesso maggiore di istocompatibilità di classe due (cellule presentanti l' antigene), CD4+ (T helper), CD8+ (T citotossiche) e cellule B sono state trovate in campioni endometriali di cavalle e il loro numero cresce durante l' endometrite. Né l'età né l' ordine di parto affligge l' espressione di CD4 e CD8 (Tunón, 1999). Non c'è evidenza che le

cavalle suscettibili all' endometrite abbiano alterazioni o deficienze nell' immunità cellulare.

5.1.2 LEUCOCITI POLIMORFONUCLEATI

L' accoppiamento naturale o l' inseminazione nella cavalla è seguita da un' infiammazione transitoria dell' utero. Kotilainen *et al.* (1994) dimostrarono che la neutrofilia dopo AI è indotta dagli spermatozoi e che la concentrazione di spermatozoi è correlata positivamente con il numero di PMN. Conseguentemente fu dimostrato da Troedsson e dai suoi collaboratori che gli spermatozoi iniziano la chemotassi neutrofilica attraverso l' attivazione del complemento (Troedsson *et al.*, 2001). I primi PMN entrano nell' utero entro un' ora dall' inseminazione artificiale, il numero più elevato si ritrova attorno a 6-12 ore e a 48 ore ne rimangono pochissimi (Katila, 1995). La risposta iniziale dei PMN non è né ritardata né diminuita nelle cavalle suscettibili (Williamson *et al.*, 1987), ma queste cavalle continuano ad avere PMNs nell' utero a causa della persistenza dell' infiammazione. Già 12 ore dopo un' infezione batterica sperimentale, cavalle sterili di categoria bioptica II mostrano di avere più PMN nei fluidi uterini rispetto alle fattrici resistenti (Katila *et al.*, 1990).

Differenti funzioni dei PMN sono state studiate *in vitro* nelle cavalle suscettibili rispetto alle resistenti, compresa la migrazione in risposta ai fattori chemotattici, la fagocitosi e la digestione intracellulare. Ma quanto sono affidabili questi studi condotti su PMNs derivati dall' utero? Essi sono una popolazione disomogenea di cellule poiché nell' infezione persistente sono continuamente richiamati dalla circolazione periferica (Liu *et al.*, 1986). Essi sono stati esposti allo stimolo batterico e hanno risposto a stimoli chemotattici, hanno migrato dal sangue ai tessuti e hanno iniziato il processo di fagocitosi. Tutto questo ha indotto di cambiamenti nella loro abilità a deformarsi, migrare e uccidere i batteri (Watson *et al.*, 1987c). Molte delle disfunzioni proposte per i PMNs prelevati dai fluidi uterini di

cavalle suscettibili possono essere collegate all' ambiente inospitale (Liu et al., 1986).

Non esistono definitive conclusioni sul fatto che l' inizio della chemotassi, le caratteristiche locomotorie o il numero iniziale di PMN o la loro abilità a fagocitare e uccidere batteri possa essere differente tra le cavalle suscettibili e quelle resistenti, tuttavia i leucociti persistono per molto tempo nelle cavalle suscettibili. Il fluido uterino infetto contiene molte sostanze chemotattiche., ad esempio alcuni metabolici dell' acido arachidonico che continuano ad attirare i neutrofili (Watson *et al.*, 1987a).

5.2 DIAGNOSI

Una valutazione completa della fattrice prima dell'accoppiamento richiede l'attenta anamnesi e l' esame fisico con particolare attenzione alla conformazione del perineo (Watson, 2000). È molto importante controllare che la cervice si dilati in modo appropriato durante l'estro e che si chiuda in diestro. Tamponi uterini dovrebbero essere eseguiti di routine nelle fattrici a rischio. Questo permetterebbe di isolare eventuali patogeni caratteristici delle fattrici suscettibili come *Escherichia Coli* non emolitico o *Streptococcus* β -emolitico (Albihn *et al.*, 2003; Card, 2005; Nielsen, 2005). La citologia e la batteriologia andrebbero sempre valutate insieme poiché il ritrovamento di neutrofili polimorfonucleati insieme a potenziali patogeni è un indicatore migliore della sola batteriologia (Nielsen, 2005).

Dopo questo esame iniziale, la conferma diagnostica di endometrite post coitale persistente viene effettuata mediante valutazione ecografia tra le ventiquattro e le quarantotto ore dopo l'inseminazione. La presenza di fluido intrauterino maggiore di 20 mm è indicativa della patologia (Watson et al., 2001; Barbacini et al., 2003; Brinsko et al., 2003).

Una diagnosi precoce permette di intervenire prontamente con trattamenti efficaci, infatti non è raro che fattrici con anamnesi di buona fertilità possano sviluppare spontaneamente l'endometrite post coitale

persistente, negando al clinico l'opportunità di un intervento profilattico (Watson, 2000).

5.2.1 ECOGRAFIA

L'accumulo di fluidi nel periodo periovulatorio è fortemente associato alla diminuzione del tasso di concepimento (Barbacini *et al.*, 2003). La presenza di due o più centimetri di fluidi durante l'estro o tra 6 e 36 ore dopo l'inseminazione è un buon indicatore della suscettibilità della cavalla all'endometrite post coitale persistente (Brinsko *et al.*, 2003). In uno studio recente il fluido intrauterino durante l'estro è stato associato a un aumento del numero di neutrofili nel lume uterino. Cavalle purosangue con fluido intrauterino al secondo o al terzo giorno dell'estro hanno una probabilità 1.4 volte maggiore di avere più di 5 neutrofili per campo a 400 X all'esame citologico (Burlson *et al.*, 2010). Tuttavia la presenza di fluido intrauterino durante l'estro non è sempre associato a endometrite batterica. Cavalle purosangue, dalle quali erano stati isolati batteri quali *E. Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Spp.* o batteri considerati non patogeni (*micrococcus*, *alpha streptococcus* o *bacillus*), presentavano fluido uterino in meno del 40% degli esami ecografici condotti immediatamente prima di ottenere la coltura uterina (17–39% in dipendenza del microrganismo). Il fluido intrauterino viene rilevato più frequentemente, in 45–55% degli esami ecografici, quando sono coinvolti streptococchi β -emolitici, *Klebsiella Pneumoniae*, *Enterobacter Cloacae* o lieviti (Burlson *et al.*, 2010). Altre anomalie ecografiche associate con un ridotto tasso di concepimento sono: un eccessivo edema prima o dopo l'inseminazione o un edema che non si estende attraverso tutta la parete uterina (Samper, 2009), o la presenza di una sottile linea iperecoica nella parete uterina che può indicare sia la presenza di essudato che la presenza di gas. Una piccola quantità di fluido uterino è normale nell'utero in estro. Tuttavia quantità di fluido superiori o uguali a 2 cm in estro o in relazione ad IA è indicativo di una DUC e la fattrice richiede particolare attenzione ed eventualmente anche un trattamento (Brinsko *et al.*, 2003).

Raccolte di liquidi infiammatori nell' utero per lunghi periodi, hanno un effetto negativo sull' utero e sulla fertilità (Katila et al., 2012). L' utero deve tornare al suo stato normale entro l'arrivo dell' embrione, 5-6 giorni dopo l'ovulazione.

Usare il fluido intrauterino come indicatore di endometrite post coitale persistente è problematico, poiché l'accumulo di fluidi è un indicatore aspecifico e può indicare infiammazione, infezione, ritardata *clearance* uterina o tutte queste condizioni. La presenza di più di 1 cm di fluido intrauterino nelle fattrici in estro non è ben correlato con la presenza di PMN alla citologia (De Borba et al., 2012). In un altro recente studio il ritrovamento di fluido intrauterino è stato associato con citologia positiva ma batteriologia negativa (Le Blanc et al., 2012).

5.2.2 CITOLOGIA E COLTURA UTERINA

La citologia endometriale è una via veloce e affidabile per valutare lo stato dell'utero durante situazioni che richiedano un'immediata risposta come l'accoppiamento o l'inseminazione (Riddle et al., 2007). Essa rileva la presenza

La coltura e la citologia uterina sono comuni tecniche per la diagnosi di endometrite, la prima per la determinazione dei patogeni, la seconda per il rilievo delle cellule infiammatorie (neutrofili). Se viene isolato un patogeno uterino e la cavalla mostra più di due neutrofili per campo a 400 X (citologia uterina positiva) si può ragionevolmente affermare che ha l'endometrite (Riddle et al., 2007). Tuttavia le cavalle possono produrre citologia uterina positiva con colture negative e *vice versa*. Un recente lavoro indica che entrambi i casi possono essere associati ad endometrite e diminuito tasso di concepimento (Nielsen, 2005; Riddle et al., 2007; Bindslev et al., 2008; Nielsen et al., 2008). Le cavalle positive per *E. coli*, *Pseudomonas*, *S. aureus* hanno pochissimi campioni citologici con più di 2 neutrofili per campo a 400 X (19–33%) rispetto a quelle positive per *Klebsiella* o *Streptococcus* β -emolitico (50–71.4%) (Burlison et al., 2010; Riddle et al., 2007). I patogeni più frequentemente associati alla presenza

di fluido intrauterino mostrano più facilmente neutrofili alla citologia rispetto a quelli non associati a fluido intrauterino. Questi dati indicano che non tutti i patogeni uterini inducono una risposta neutrofilica acuta e supportano l'ipotesi che il ritrovamento di fluido intrauterino indica infiammazione acuta e non necessariamente infezione batterica. Altre possibili cause di infiammazione acuta neutrofilica includono: pneumovagina, urovagina, risposta al seme e eccessiva produzione di muco endometriale.

Per determinare l'importanza relativa di coltura e citologia è utile avere un "gold standard" per la presenza o assenza della patologia con il quale i risultati possono essere confrontati per generare una stima della sensibilità (percentuale di malati positivi al test) e della specificità (percentuale di sani negativi al test) (Le Blanc e Causey, 2009). Utilizzando questo metodo, Nielsen (2005) utilizzò la presenza di infiltrato neutrofilico nell'epitelio luminale e nello strato compatto come gold standard per indicare la presenza della patologia (endometrite) in 212 biopsie uterine. Sulla base dell'infiltrazione neutrofilica, egli paragonò la coltura ottenuta dal campione bioptico, la coltura ottenuta da tamponi endometriali e la citologia ottenuta strisciando la biopsia su un vetrino. Di queste tre tecniche (coltura da biopsia, coltura da tampone e citologia) la sensibilità risultò essere 0.82, 0.34, 0.77 e la specificità 0.92, 1.0, 1.0 rispettivamente. Risulta subito evidente come la coltura ottenuta da tamponi uterini, con una sensibilità del 0.34 sia soggetta ad un elevato numero di falsi negativi mentre la citologia e la coltura da biopsia uterina sono due volte più sensibili nel rilevare la presenza dell'endometrite. Un altro aspetto che colpisce immediatamente è l'elevata specificità delle tre tecniche, che si traduce in un bassissimo numero di falsi positivi (Nielsen, 2005). Questi dati indicano che i clinici devono confrontarsi con un elevato numero di falsi negativi nelle colture ottenute da tamponi uterini e che le metodiche per la rilevazione dei patogeni richiedono ulteriori studi per essere migliorate. Le Blanc et al. (2007) utilizzando lo stesso gold standard di Nielsen (2005) confrontò la coltura uterina, con la citologia e gli indicatori di infiammazione ottenuti da *low volume uterine flushes*, una

tecnica inizialmente proposta da Ball et al. (1988). Usando i lavaggi uterini a basso volume la sensibilità della coltura risultava essere di 0.71 (il doppio di quella ottenuta con i tamponi uterini e riportata più sopra) e la sensibilità della citologia risultava essere 0.8. La specificità del lavaggi uterini a basso volume risultò essere di 0.86 per l' esame colturale e di 0.67 per la citologia. La citologia ottenuta da *flush* uterino quindi tende a sottovalutare l' infiammazione, con un 70% di colture positive che corrispondevano a citologia negativa (la stima clinica delle colture falsamente positive). Tuttavia se i parametri mancanza di detriti citologici e efflusso limpido venivano aggiunti alla definizione di citologia negativa, solo l' 11% delle colture positive venivano clinicamente considerate come false. L'efflusso torbido è altamente correlato alla presenza di batteri. Il miglioramento della sensibilità delle colture ottenute tramite *flush* rispetto a quelle ottenute da tamponi è da imputarsi ad un maggior ritrovamento di *E. coli* nel *flush* uterino. Il ritrovamento di *E. coli* è caratterizzato da citologia con presenza di detriti da moderata ad elevata. Quindi la coltura da *flush* uterino può essere utile per identificare le fattrici affette da endometrite da *E. coli* (Le Blanc et al., 2007).

Uno studio clinico ampio, che ha coinvolto 2123 colture uterine e campioni citologici appaiati, invece di utilizzare la biopsia come gold standard ha comparato i risultati del tampone uterino con i tassi di concepimento, un parametro clinico più rilevante. I campioni citologici endometriali venivano prelevati ruotando l' estremità di un tampone per coltura protetto sulla superficie dell' endometrio. Le secrezioni raccolte dal tampone venivano strisciate su un vetrino direttamente in scuderia. Il vetrino era successivamente fatto asciugare all' aria e fissato. Similmente allo studio di Nielsen (2005) le cavalle ritenute affette da endometrite sulla base della citologia uterina erano il doppio di quelle giudicate affette da endometrite sulla base della coltura uterina. Inoltre i tassi di concepimento per ciclo erano influenzati in modo significativo dal numero di neutrofili per campo a 400 X. Le cavalle con 0-2 neutrofili per campo avevano un tasso di gravidanza per ciclo a 28 giorni di gestazione del 60% confronto al 36% di quelle con 2-5 neutrofili per campo e al 23% di quelle con più di 5

neutrofili per campo. Anche l'isolamento di batteri dalla coltura uterina è stato messo in relazione con una diminuzione del tasso di gravidanza (36%), anche quando la corrispettiva citologia era definita normale con un numero di neutrofili per campo pari a 0-2 (Riddle et al., 2007). Questi studi enfatizzano l'importanza della valutazione dei dati di laboratorio nel contesto dei rilievi clinici, dal momento che la correlazione tra coltura e citologia uterina varia in base al microrganismo isolato. Essi indicano anche che i tre test anche presi singolarmente possono indicare la presenza della patologia.

Non tutti i patogeni uterini producono una risposta neutrofilica e fluidi intrauterini, i classici segni dell'inflammazione uterina, è quindi importante avere a disposizione altri metodi di diagnosi. La coltura ottenuta da biopsia endometriale o il liquido ottenuto da *flush* uterino sono più sensibili nell'identificazione dei patogeni uterini rispetto alla coltura da tampone uterino (LeBlanc, 2010).

De Borja et al.(2012) nel corso di due esperimenti hanno dimostrato che la citologia endometriale è un mezzo fondamentale per valutare lo stato di salute dell'endometrio, indipendentemente dal protocollo utilizzato. Nella prima fase della sperimentazione venivano valutate tre metodiche per il prelievo di cellule endometriali. L'uso di tampone protetto, spazzolino o brush portò a risultati simili. Per motivi di convenienza lo spazzolino fu il metodo scelto per il secondo esperimento, nel quale venivano confrontati i risultati tra rilievo ecografico e citologia uterina. Il ritrovamento di un 36,5% di cavalle positive alla citologia ma senza fluidi intrauterini suggerisce una maggior precisione di questa procedura diagnostica rispetto all'esame ecografico. Probabilmente in alcune fattrici l'inflammazione endometriale avviene con fluidi intrauterini minori di 10 mm e in questi casi la citologia è l'opzione migliore per una diagnosi rapida e precisa. In cinque casi (25%) la presenza di fluido intrauterino non era associata alla presenza di PMN, il che significa che la diagnosi basata solamente sul reperto ecografico può fornire risultati falsamente positivi.

A causa dei molteplici fattori che possono influire sulla fertilità, i clinici hanno la necessità di adeguare le loro tecniche diagnostiche allo specifico caso. Dati recenti indicano che l'ecografia e i reperti citologici ottenuti da cavalle con endometrite differiscono a seconda dei patogeni implicati e che i tamponi uterini sono meno sensibili della biopsia endometriale o del *low volume uterine flushing* nell'identificare microrganismi gram negativi (LeBlanc, 2010).

Per favorire la propria sopravvivenza alcuni batteri possono ridurre l'attività metabolica, spesso definita latenza (dormancy), per formare infezioni quiescenti (Young et al., 2002; Lewis, 2007). I fattori che promuovono la riattivazione possono migliorare la nostra capacità di coltivare batteri dormienti mediante la loro attivazione e così migliorare la diagnosi e i potenziali trattamenti (Kana e Mizrahi, 2010).

6 INSEMINAZIONE ARTIFICIALE

I fattori che influenzano la risposta della femmina all'inseminazione sono molti.

La composizione del seme può variare in molti modi e questo influenza la risposta infiammatoria uterina. Studi sono stati condotti su motilità, concentrazione e numero degli spermatozoi, così come sul volume, tipo di processazione del seme, extenders, diluizione e percentuale di SP presente nonché su sito e tecnica di inseminazione e tipo di cavalla.

6.1 PLASMA SEMINALE

Studi *in vitro* suggeriscono che il PS modula e reprime il legame delle cellule spermatiche con i PMN e la fagocitosi in cavalli e suini. Tuttavia tutti gli studi sulle cavalle (Katila, 2005) e sulle scrofe (Bischof *et al.*, 1994) *in vivo* hanno dimostrato che il plasma seminale stesso causa neutrofilia. Il SP e lo *skim milk extender* causano un aumento dei PMN in modo simile in fluidi ottenuti da lavaggi uterini 2 e 4 ore dopo l'infusione, ma a 24 ore il numero di PMN indotti dall'extender sono molto più elevati di quelli indotti dal SP (Fiala *et al.*, 2002). Quetin *et al.* (2001) mostrarono che biopsie ottenute 6 ore dopo l'IA con SP o con spermatozoi sospesi in un *extender* salino presentavano un numero di PMN simile; tra le 6 e le 48 ore però si assisteva a una minor riduzione dei PMN nelle biopsie ottenute dalle cavalle che avevano ricevuto l'*extender* (Quetin *et al.*, 2001). In un altro studio gli spermatozoi centrifugati e sospesi nel plasma seminale inducevano più PMN rispetto agli spermatozoi sospesi in *skim milk extender* (Portus *et al.*, 2005) Palm *et al.* (2008) invece dimostrarono che il SP fa aumentare gli eosinofili 12 ore dopo l'inoculazione intrauterina, ma l'infiammazione indotta dal plasma seminale è della stessa entità di quella indotta dal PBS o dallo *skim milk extender*. Questi studi mostrano che inizialmente (2-6 ore dopo l'infusione) il SP induce un maggior numero di PMN rispetto agli *extenders*. Più tardi (24-48 ore) i PMN sono più elevati in seguito all'infusione di *extenders* rispetto all'infusione di SP. Una possibile

spiegazione di questo comportamento è che il SP aumenta l'eliminazione dei PMN, oppure la maggiore risposta iniziale dei PMN indotta dal SP potrebbe essere più efficace nel rimuovere lo sperma risultando così in una minor durata dell'infiammazione.

6.2 CONCENTRAZIONE E NUMERO TOTALE DEGLI SPERMATOZOI E VOLUME DELLA DOSE INSEMINANTE

Kotilainen et al. (1994) riscontrarono che il seme concentrato ($400 \times 10^6/\text{ml}$) causa maggior neutrofilia di un seme meno concentrato ($30\text{-}60 \times 10^6/\text{ml}$): il numero di PMN in lavaggi uterini 6 ore dopo IA di cavalle è significativamente più elevato se viene usato seme congelato, seme congelato addizionato di PS o seme fresco concentrato rispetto a quando viene usato un seme diluito (Kotilainen *et al.* 1994).

Fiala et al. (2007) trovarono un maggior numero di PMN in lavaggi uterini e in biopsie ottenute 2 e 4 ore dopo l'inseminazione di cavalle con seme ad alta concentrazione di spermatozoi (furono confrontate concentrazioni di $5,25$ e $50 \times 10^6/\text{ml}$), ma un numero più basso di PMN a 24 ore dall'inseminazione con il seme più concentrato (Fiala *et al.* 2007).

Sinnemaa et al. (2005) inseminarono 12 cavalle con 1×10^9 spermatozoi in 2 o 100 ml di *extender*; la concentrazione di cellule spermatiche era di 500 e 10×10^6 rispettivamente. Nonostante il numero di PMN raccolti mediante tamponi e lavaggi uterini a 4 ore $8,1$ e $5,8 \times 10^6$ per 2 ml e $0,2 \times 10^6$ per 100 ml, la differenza non era statisticamente significativa. Il tasso di eliminazione di spermatozoi e fluido non mostrava variazioni e le contrazioni uterine si modificavano solo a 4 ore (Sinnemaa *et al.*, 2005). Quindi non sembra che il volume della dose inseminante influenzi l'infiammazione uterina.

6.3 QUALITÀ DELLO SPERMA

Il tasso di concepimento di fattrici inseminate con seme congelato, piuttosto che con seme fresco, è minore. Quando Kotilainen et al. (1994) mostrarono che il seme congelato evoca una neutrofilia più intensa, a causa dell'elevata concentrazione di spermatozoi (Kotilainen *et al.*, 1994), alcuni interpretarono la forte risposta infiammatoria come un fattore negativo per la fertilità. Fu anche ipotizzato che la rimozione del plasma seminale durante il processo di crioconservazione potesse concorrere all'aumento dell'intensità dell'infiammazione e alla diminuzione della sopravvivenza degli spermatozoi. Tuttavia è stato già detto che gli spermatozoi sospesi nel SP inducono una risposta infiammatoria maggiore rispetto agli spermatozoi sospesi nell'*extender* (Portus *et al.*, 2005) e l'aggiunta di SP a seme scongelato non fa diminuire il numero di PMN a 6 ore dall'IA (Kotilainen *et al.*, 1994). In più si pensava che la grande proporzione di spermatozoi morti presenti nel seme congelato potesse causare una maggiore reazione infiammatoria, tuttavia il surnatante di seme scongelato centrifugato causa un afflusso di PMN simile a quello dato dagli *extenders* 6 ore dopo l'infusione, quindi gli spermatozoi morti non rilasciano enzimi che possano esacerbare l'infiammazione (Kotilainen *et al.*, 1994). Katila (1997) esaminò la presenza di PMN in fluidi uterini ottenuti mediante tamponi 5 ore dopo IA con spermatozoi vivi oppure uccisi con microonde e non riscontrò nessuna differenza (Katila, 1997). Ovviamente la presenza di spermatozoi morti non causa problemi alla fertilità.

Al contrario, un'inseminazione addizionale con spermatozoi inattivati termicamente accresce di due cellule la produzione di embrioni nel topo. Gli spermatozoi quindi potrebbero avere delle funzioni fisiologiche che vanno al di là della fecondazione (Chaykin and Watson 1983).

Nonostante il tasso di concepimento dopo inseminazione con seme congelato sia più basso di quello dopo IA con seme fresco, le differenze

più rilevanti si riscontrano nelle cavalle anziane e con problemi di fertilità (Sieme *et al.* 2004). Questo riscontro ha portato a pensare che il seme congelato fosse più dannoso per le cavalle problema a causa della maggior risposta infiammatoria che potrebbe indurre dopo IA e in particolare in quelle cavalle suscettibili all' endometrite che potrebbero rispondere con un endometrite post coitale severa. A questo proposito Güvenc *et al.* (2004) inseminarono delle cavalle problema e delle cavalle sane con seme congelato, ma le cavalle problema non mostrarono una risposta infiammatoria maggiore rispetto a quelle normali (Güvenc *et al.*, 2004).

Se ne deduce che il basso tasso di concepimento ottenuto usando seme congelato va attribuito alla bassa qualità degli spermatozoi o a qualche proprietà sconosciuta delle cavalle problema, ma non alla risposta infiammatoria (Katila, 2012).

6.4 SITO E TECNICA INSEMINATIVA

Quando le cavalle vengono inseminate alla sommità del corno uterino o nel corpo dell'utero con 200 o 20×10^6 spermatozoi decongelati, il numero di PMN non varia 24 ore dopo l' AI, ma la quantità di fluido uterino è significativamente più bassa nelle cavalle inseminate nel corno uterino con 20×10^6 spermatozoi rispetto agli altri tre gruppi (Güvenc *et al.*, 2005). Questi risultati suggeriscono che l' AI profonda nel corno uterino non causi una maggiore infiammazione rispetto all' inseminazione nel corpo dell'utero, piuttosto è vero il contrario.

Sieme *et al.* (2004) non riscontrarono differenze nel tasso di concepimento associato a differenti siti e tecniche inseminative (corpo uterino, transrettale profonda, isteroscopica profonda), ma l'interazione tra la tecnica inseminativa e il tipo di cavalla è significativo: l' IA isteroscopica risulta in un tasso di concepimento più alto rispetto all' IA nel corpo uterino nelle cavalle normali, ma nelle cavalle problematiche avviene in contrario. Tuttavia non furono rilevate differenze nell'accumulo di fluidi uterini.

6.5 GLI EXTENDERS MODULANO L' INFIAMMAZIONE

Gli *extenders* più usati per il seme fresco equino sono a base di latte scremato. È stato dimostrato che questi inducono una risposta infiammatoria uterina molto lieve, equiparabile a quella indotta dal PBS e significativamente minore di quella indotta dal seme (Kotilainen *et al.*, 1994; Fiala *et al.*, 2002; Quetin *et al.*, 2001).

Il tuorlo d' uovo, insieme al glicerolo, è uno dei più importanti componenti degli *extenders* utilizzati per la conservazione del seme equino congelato. Per anni è stato ipotizzato che questo tipo di sostanza potesse indurre una forte risposta infiammatoria, anche di tipo allergico, in seguito ad AI con seme congelato. Tuttavia Kotilainen *et al.* (1994) mostrarono che il tuorlo d' uovo induce la comparsa di pochissimi PMN. Anche Palm *et al.* (2008) riportarono che il tuorlo d' uovo induce veramente pochi PMNs rispetto al PBS, al latte scremato o al SP (Palm *et al.*, 2008). Il tuorlo d' uovo è ricco di progesterone e Katila (2012) suggerisce che questo possa esercitare effetti antinfiammatori (Katila, 2012)

In contraddizione con quanto succede negli equini, sembra che gli *extenders* usati nei suini inducano una risposta infiammatoria maggiore rispetto al plasma seminale. Questo potrebbe essere dovuto alla diversa composizione degli *extenders* utilizzati nel suino (Katila 2012).

6.6 GESTIONE DELL'INSEMINAZIONE ARTIFICIALE

Ottimizzare la gestione dell' inseminazione è l'aspetto più importante per ridurre la suscettibilità delle fattrici all' endometrite post coitale persistente.

La scelta del momento più adatto per l'inseminazione o per l'induzione dell'ovulazione permette di effettuare un'unica inseminazione per estro (Pycock, 2009) evitando così che gli spermatozoi vengano esposti ad un ambiente uterino infiammato (Alghamdi *et al.*, 2001; Troedsson *et al.*, 2001).

L'inseminazione precoce aumenta la possibilità che i fluidi accumulati possano essere espulsi prima che la cervice cominci a chiudersi rapidamente dopo l'ovulazione. Inoltre i meccanismi di difesa immunitari sono più pronunciati in estro che in diestro (Katila, 1996).

Mantenere una coretta igiene della fattrice durante l'inseminazione, fasciando la coda e pulendo vulva e perineo, aiuta a minimizzare la contaminazione del canale genitale durante la monta o l'inseminazione artificiale (Pycock, 2009).

E' importante sapere che le fattrici anziane inseminate con seme congelato hanno maggiori probabilità di sviluppare l'endometrite post coitale persistente poiché la quantità di plasma seminale viene drasticamente ridotta durante il processo di crioconservazione e quindi viene perso il suo effetto modulatore dell'infiammazione (Troedsson *et al.*, 2001).

Le nuove tecniche d'inseminazione, ad esempio quelle che utilizzano seme sessato o inseminazioni intrauterine profonde ecoguidate, richiedono un minor numero di spermatozoi (Guevenc *et al.*, 2005).

7 TERAPIA

Lo scopo del trattamento è quello di eliminare completamente l'accumulo di fluidi, contaminanti e sottoprodotti infiammatori entro novantasei ore (Katila, 1996) in modo da garantire un ambiente uterino sano e accogliente per l'embrione al momento del suo arrivo in utero il quinto giorno dopo l'ovulazione (Betteridge *et. al.*, 1982; Card, 2005). La correzione dei difetti anatomici, ad esempio la vulvoplastica di Caslik, proteggono l'utero da aspirazione di aria e da continue contaminazioni esterne (Causey, 2006). La correzione dei difetti anatomici unitamente alla neutralizzazione dei batteri virulenti e al controllo dell' infiammazione post-coitale sono gli obiettivi da perseguire per ottenere un successo terapeutico.

L'infiammazione post coitale viene comunemente trattata supportando la *clearance* uterina mediante lavaggi uterini e la somministrazione di ossitocina (10-25 UI i.m. o e.v.) o clorprostenolo (250 µg i.m.) (Brinsko *et al.*, 1990; Le Blanc *et al.*, 1994; Troedsson *et al.*, 1995; Combs *et al.*, 1996; Pycock, 2009). In alcuni casi l'utero può essere infuso con antibiotici dopo l' accoppiamento. Le endometriti batteriche o fungine sono ordinariamente trattate per 3-5 giorni durante l' estro con antibiotici somministrati per via intrauterina e/o sistemica associati a lavaggi uterini (Le Blanc, 2009).

Il lavaggio uterino viene effettuato infondendo due o tre litri di soluzione salina o Ringer lattato, sterile e tiepida utilizzando un catetere di grosso diametro, come quello usato per il recupero d embrioni, fino a che il fluido recuperato risulti limpido. I lavaggi andrebbero ripetuti finchè il fluido recuperato non risulti limpido. Dal momento che le cavalle suscettibili hanno una ridotta clearance è utile misurare la quantità di fluido recuperato oppure esaminare la cavalla ecograficamente dopo il *flushing* ed eventualmente somministrare ossitocina (Pycock, 2009); 10 UI prima dell'ovulazione e 25 UI dopo l'ovulazione per via intramuscolare o endovenosa (Guthjahr *et. al.*, 2000).

Il lavaggio uterino ha lo scopo di rimuovere l'accumulo di fluidi e sottoprodotti infiammatori, che possono interferire con la funzione dei neutrofili o con l'efficacia degli antibiotici. Inoltre il *flushing* stimola la contrattilità e il reclutamento di neutrofili attraverso l'irritazione meccanica dell'endometrio (Pycock, 2009). Il lavaggio uterino viene eseguito dopo l'accoppiamento, non prima di quattro ore dall'inseminazione, per permettere agli spermatozoi motili di raggiungere le tube (Rigby *et al.*, 1999). Tuttavia se viene rilevata una consistente quantità di fluido (maggiore di 2 cm), è corretto praticare un flushing anche prima dell'inseminazione.

La contrattilità del miometrio può essere stimolata mediante la somministrazione di ossitocina. Questa sostanza può essere somministrata prima dell'accoppiamento, qualora venga rilevato accumulo di fluidi intrauterini maggiore di 0,5 cm, in un'unica somministrazione di 20 UI. Se il fluido persiste o è maggiore di 2 cm è consigliabile ripetere la somministrazione. Dopo l'accoppiamento l'ossitocina viene somministrata ogni 4-6 ore, intramuscolo (Pycock, 2009).

Il giorno in cui viene somministrata l'ossitocina gioca un ruolo importante per la contrattilità dell'endometrio (Guthjahr *et al.*, 2000). Nelle cavalle suscettibili si dovrebbe prevedere un intervallo di tempo maggiore tra l'accoppiamento e l'ovulazione (ventiquattro, quarantotto ore) (Guthjahr *et al.*, 2000). Infatti il trattamento con ossitocina dovrebbe essere cominciato nel periodo preovulatorio, poiché la risposta dell'endometrio all'ossitocina è migliore con bassi livelli di progesterone e alti livelli di estrogeni (Guthjahr *et al.*, 2000). Se l'ossitocina viene somministrata dopo l'ovulazione la dose deve essere più elevata per raggiungere l'effetto (Guthjahr *et al.*, 2000). Tuttavia bisogna prestare cautela nel somministrare dosi elevate di ossitocina (superiori alle 25 UI) poiché possono dare contrazioni tetaniche inefficaci ai fini della *clearance* e conseguente ritenzione del fluido uterino (Cadario *et al.*, 1999).

Un'alternativa è la somministrazione di clorprostenolo, un analogo della prostaglandina, che elimina i fluidi uterini più rapidamente della prostaglandina-2 α e ha una durata d'azione maggiore rispetto

all'ossitocina (Combs *et al.*, 1996). Il clorprostenolo può essere usato ad un dosaggio di 250 µg per via intramuscolare, iniziando quattro ore dopo l'accoppiamento (Le Blanc, 2003). Questo farmaco ha degli effetti negativi sui livelli di progesterone durante le prime fasi della gravidanza, dal secondo al settimo giorno dopo l'ovulazione, ma non influenza il tasso di concepimento dal momento che i livelli di progesterone ricominciano a salire dopo il giorno sette e raggiungono valori normali attorno al nono giorno (Nie *et al.*, 2003).

I trattamenti classici per l'endometrite includono irrigazioni uterine, somministrazione di ecbolici e infusioni intrauterina di antibiotici. Queste terapie non sono efficaci in tutti i casi di endometrite. Studi clinici recenti hanno dimostrato un miglioramento del tasso di concepimento, in cavalle cronicamente infertili, dopo somministrazione di mucolitici o di steroidi che modulano la risposta infiammatoria. Inoltre l'infusione intrauterina di agenti chelanti, usati per penetrare il biofilm, sono stati utilizzati con successo nel trattamento di infezioni croniche da gram negativi e lieviti che non rispondevano alla terapia di routine (Le Blanc, 2010).

7.1 ANTIINFIAMMATORI

Nei vent'anni passati il trattamento dell'endometrite post coitale era basato sui metodi che favoriscono la clearance uterina meccanica. Tuttavia è stato dimostrato che la modulazione della risposta infiammatoria con corticosteroidi somministrati al momento dell'inseminazione fa aumentare il tasso di concepimento in cavalle con accumulo di fluidi intrauterini o infiammazione uterina (Bucca *et al.*, 2008; Papa *et al.*, 2008a). L'immunomodulazione può aiutare a ristabilire i meccanismi omeostatici dell'infiammazione locale riducendo la formazione di citochine proinfiammatorie. Ciò può essere d'aiuto soprattutto nelle cavalle anziane che possono soffrire di *inflamm-aging*. L'*inflamm-aging* è una risposta infiammatoria sistemica di bassa intensità associata all'età avanzata. È stata riscontrata negli umani e negli equini,

ed è caratterizzata da un aumento nella produzione di citochine proinfiammatorie (Adams *et al.*, 2008, 2009). Le cellule mononucleate prelevate dal sangue periferico di cavalle anziane hanno mostrato di produrre più citochine infiammatorie rispetto a quelle delle cavalle giovani; inoltre i cavalli anziani e grassi hanno anche una maggior quantità di linfociti e monociti che producono citochine infiammatorie rispetto a cavalli anziani e magri. La perdita di peso nelle fattrici anziane e grasse riduce la percentuale di linfociti e monociti IFN γ e TNF α -positivi e riduce i livelli sierici di TNF α . Quando il peso e la massa adiposa crescono in questi cavalli anziani, si assiste ad un aumento della produzione di citochine infiammatorie (Adams *et al.*, 2008, 2009).

Una singola iniezione di desametasone somministrata entro un ora dall'accoppiamento (50 mg, e.v.; circa 0.1 mg/kg) combinate con le terapie di routine (lavaggi uterini, farmaci ecbolici e in alcuni casi antibiotici intrauterini). Risultano in un aumento del tasso di concepimento in cavalle con anamnesi di accumulo di fluidi intrauterini dopo l'ovulazione e in quelle con cervice incompetente (Bucca *et al.*, 2008). Le fattrici trattate mostrano una diminuzione dell'edema e dei fluidi intrauterini ed un fluido uterino più limpido. Il desametasone non incrementa il tasso di concepimento in generale in tutte le fattrici, ma solo in quelle con tre o più fattori di rischio di suscettibilità all'endometrite. Tra i fattori di rischio sono inclusi anamnesi di problemi riproduttivi, cattiva conformazione del perineo, cervice incompetente, lesioni vulvari non riparate dopo il parto, coltura endometriale positiva, presenza di fluido endometriale maggiore di 2 cm prima dell'inseminazione, presenza di fluido endometrale dopo l'accoppiamento di 1,5-2 cm o maggiore, persistenza del fluido endometriale per più di 36 ore dopo l'inseminazione (Bucca *et al.*, 2008). L'aumento del tasso di concepimento è stato osservato anche in fattrici con anamnesi di accumulo di fluido intrauterino in seguito a somministrazione di prednisolone 9-alpha acetato (0,1 mg/kg) somministrato per quattro giorni, ad intervalli di 12 ore, iniziando il trattamento 48 ore prima dell'inseminazione (Papa *et al.*, 2008a). Al contrario la somministrazione di desametasone (10 o 20 mg i.m.) 6-12 ore

dopo l'inseminazione non migliora il tasso di gravidanza di cavalle a sangue caldo (n = 753 cicli) con storia di ritenzione di fluidi intrauterini (Vandaele *et al.*, 2010). Una possibile spiegazione di questi risultati contrastanti è che i corticosteroidi bloccano sia la cicloossigenasi che la 5-lipoossigenasi. La seconda è responsabile della formazione di leucotriene B, un potente fattore chemotattico per i neutrofili. Riducendo la chemotassi neutrofilica, diminuisce anche il numero di neutrofili nell' utero in seguito alla deposizione di seme e questo potrebbe diminuire la gravità e la durata della risposta infiammatoria post coitale.

In uno studio recente, in contrasto con quanto affermato da Bucca *et al.* (2008), de Ruijter-Villani *et al.*(2012) hanno dimostrato che un'iniezione intravaginale di 50 mg di desametasone un'ora prima della IA riduce l'edema post-inseminazione ma non sembra prevenire l'accumulo di fluidi o neutrofili intrauterino. Né sembra sopprimere l'espressione endometriale di mediatori infiammatori come cicloossigenasi-2 (COX2), lipoossigenasi-5 (LOX5), e ossido nitrico (NO). Questi mediatori dell'infiammazione sono attivi soprattutto durante la fase acuta ed è possibile che la tempistica del campionamento possa aver influito sui risultati ottenuti. Tuttavia almeno per quanto riguarda l'NO, un altro studio ha confermato che una terapia con glucocorticoidi effettuata per tre giorni non altera la concentrazione di NO in flushings uterini (Wolf *et al.*, 2012).

La presenza di risultati così contraddittori non incoraggia l'utilizzo di questi farmaci per la terapia dell'endometrite post-coitale persistente. Tuttavia, qualora si decida di farne uso, le candidate vanno scelte con cura poiché un uso errato in fattrici con endometrite batterica potrebbe esacerbare l' infezione (Le Blanc, 2010).

7.2 MUCOLITICI

Non tutte le infezioni rispondono ai trattamenti antibiotici e alle irrigazioni uterine. Il fallimento del trattamento può dipendere da una contaminazione continua data da anomalie anatomiche del tratto genitale

caudale, dalla degradazione dell' antibiotico da parte degli essudati uterini, dalla produzione di biofilm da parte dei microrganismi coinvolti. Lavori precedenti indicano che la produzione di muco aumenta durante l' infiammazione uterina indotta sperimentalmente (Freeman *et al.*, 1990) e nelle fattrici con ritardata *clearance* uterina o endometrite batterica (Causey *et al.*, 2000,2008). Le fattrici con endometrite cronica mostrano un aumento dello spessore dello strato di muco che ricopre l' endometrio e dell' intensità della colorazione sia del muco intracellulare che di quello extracellulare, oltre alla perdita di cellule epiteliali (Causey *et al.*, 2008). Una quantità eccessiva di muco o di essudato può interferire con la penetrazione degli antibiotici, rendere gli aminoglicosidi chimicamente inerti o interferire con il trasporto spermatico. I trattamenti che prevedono l' uso di mucolitici possono aiutare a rimuovere il muco aumentando l'efficacia degli antibiotici intrauterini. Le sostanze solventi e mucolitici vengono aggiunti alle irrigazioni con lo scopo di rimuovere essudato, muco e biofilm. Le sostanze utilizzate includono dimetilsolfossido (DMSO), kerosene e N-acetylcysteina. Ognuno di questi composti sembra avere qualche effetto benefico. Sedici cavalle sterili infuse con una soluzione al 30% di DMSO dopo l' accoppiamento mostrarono un tasso di concepimento più elevato rispetto alle fattrici infuse con soluzione salina (Ley *et al.*,1989). La terapia intrauterina con DMSO risulta anche in un miglioramento della classificazione bioptica dell' endometrio in 18 su 27 cavalle, mentre solo 2 fattrici su 18 mostrarono miglioramento dopo infusione di soluzione salina. L' infusione di 15 ml di kerosene in cavalle con vario grado di patologia endometriale provoca un' endometrite da moderata a severa, grave edema e produzione di essudato simile al siero. Metà delle cavalle mostrò anche necrosi dell' epitelio luminale da moderata a grave. Le cavalle furono accoppiate al ciclo successivo e sorprendentemente, 50% delle cavalle con categoria II o III portarono a termine la gravidanza. Nonostante il kerosene sia associato a consistenti eventi infiammatori, la gravidanza ha potuto stabilirsi grazie alla rimozione di muco ed essudato mediante la distruzione necrotica dell' epitelio (Bracher *et al.*, 1991).

L' N-acetylcysteina è un mucolitico che distrugge i legami disolfuro tra le molecole del polimero di mucina, riducendo la viscosità del muco; inoltre possiede proprietà antiossidanti e forse anche antimicrobiche (Zuin *et al.*, 2005; Estany *et al.*, 2007; Duru *et al.*, 2008). L' N-acetylcysteina è stata usata per disturbi del tratto respiratorio come la polmonite e i disturbi associati alla fibrosi cistica nell' uomo, la ritenzione del meconio nei neonati sia umani (Weller e Williams, 1986; Burke *et al.*, 2002) che equini e la polmonite da aspirazione di meconio nel puledro (Morresey, 2008). Molteplici studi supportano i benefici apportati dalle sue proprietà antiossidanti specialmente nei disturbi infiammatori cronici (Kasielski e Novak, 2001; Zuin *et al.* 2005; Estany *et al.*, 2007; Duru *et al.*, 2008). Recentemente sono stati valutati i suoi effetti sull' endometrio (Gores-Lindholm *et al.*, 2009). Biopsie endometriali furono ottenute da 12 cavalle fertili e 10 sterili prima e dopo l' infusione di una soluzione di N-acetylcysteina al 3.3% e confrontate con quelle di cavalle infuse con soluzione salina. Il secondo e il terzo giorno l' utero di tutte le cavalle fu irrigato con una soluzione di Ringer lattato e in seguito fu ottenuta una seconda biopsia. Le biopsie endometriali furono classificate secondo il metodo di Kenney (Kenney, 1978) da un veterinario certificato e i cambiamenti dell' architettura epiteliale e la distribuzione di muco furono misurate con l'analisi delle immagini. I dati indicano che l' N-acetylcysteina non è dannosa per l' endometrio e che può controbilanciare l' effetto irritante della soluzione salina, che si riflette come un aumento dell' altezza delle cellule nelle cavalle controllo. Come ulteriore evidenza che la NAC non è dannosa e che può apportare effetti benefici, 20 cavalle purosangue ognuna accoppiata 2-5 volte nel 2007 e 2008 e con un' anamnesi di endometrite furono accoppiate naturalmente tra maggio e giugno 2008. Le cavalle ricevettero una soluzione allo 0.6% di N-acetylcysteina nel ciclo precedente (10) o 48 ore prima dell' accoppiamento (10), in aggiunta ai trattamenti tradizionali. L'infusione prima dell'accoppiamento fu associata con tassi di concepimento maggiori di quelli attesi dal momento che 17 cavalle su 20 (85%) concepirono e partorirono nel 2009 (Gores-Lindholm *et al.*, 2009). Prima di questo studio

l'uso razionale dell' N-acetylcysteina come infusione intrauterina consisteva nella rimozione di muco, essudati e biofilm. Tuttavia siccome l' aumentata viscosità del muco è associata a una limitazione nella progressione degli spermatozoi nella vacca (Rutllant et al., 2005), è stato anche ipotizzato che la NAC potrebbe migliorare il trasporto degli spermatozoi nelle cavalle con muco eccessivamente denso distruggendo i ponti disolfuro crociati tra i polimeri di mucina.

In un recente studio l' N- acetylcysteina veniva somministrata per via orale (10mg/kg bid). La somministrazione per via orale ha il vantaggio di essere semplice e rapida. Il trattamento era cominciato non appena rilevato l'estro (follicolo > di 3 ed edema endometriale) e veniva protratto per 5 giorni. Il giorno uno e il giorno 5 veniva prelevato del muco endometriale e il giorno 5 anche una biopsia endometriale. I parametri valutati erano le proprietà reologiche del muco e, per quanto riguarda la biopsia, l'integrità dell'epitelio, il numero di neutrofili e l' espressione di COX-2 ed altri marker infiammatori. A differenza di quanto riportato dagli altri autori, in questo lavoro non si ebbe una diminuzione della viscosità del muco ma al contrario un aumento della viscosità che doveva essere necessariamente legato alla somministrazione di NAC in quanto non avveniva nel gruppo controllo e non era influenzata da effetti del progesterone poichè tutte le cavalle ovularono solo dopo la fine del trattamento. In ogni caso la somministrazione di NAC era associata ad una diminuzione del numero de polimorfonucleati e dell' espressione di COX-2, aveva quindi un effetto antiinfiammatorio (Witte, 2012).

7.3 COMPOSTI CHELANTI

Studi nella fattrice e in altre specie mostrano che agenti chelanti (Tris-EDTA, Tricide®) possono potenziare l' azione degli antimicrobici dissolvendo l'essudato e disintegrando il biofilm. Questo è stato dimostrato in cani con otiti refrattarie, piodermiti, osteomieliti, fistole multiple, riniti e cistiti (Blue et al., 1974; Farca et al., 1993; Sparks et al.,

1994; Ashworth e Nelson, 1990; Bjorling e Wooley, 1982; Wooley *et al.*, 1979; Wooley *et al.*, 1974; in Le Blanc, 2010). *Pseudomonas* isolata dall'utero di fattrici con endometrite cronica mostravano una diminuita crescita o morte quando esposti ad una soluzione di Tris-EDTA (Kirkland *et al.*, 1983). È stato dimostrato che l'aggiunta di Tris-EDTA a penicillina, ampicillina, ossitetraciclina, neomicina e amikacina ha effetti sinergici (Weinstein *et al.*, 2006). Un recente studio ha dimostrato che la tricide[®], un agente chelante di terza generazione, aumenta *in vitro* l'attività dei farmaci antimicotici verso i comuni patogeni fungini isolati dagli occhi di cavalli con cheratite micotica (Weinstein *et al.*, 2006). Il meccanismo d'azione degli agenti chelanti non è completamente conosciuto ma si pensa che queste sostanze agiscano chelando calcio e/o magnesio della membrana esterna dei batteri alterando l'integrità e la permeabilità della parete batterica. Il danno alla parete batterica facilita il collasso osmotico della cellula. A differenza dei batteri i funghi hanno una parete cellulare composta prevalentemente da polisaccaridi (beta-glucani e chitina) e proteine. In questo caso si pensa che la rimozione dei cationi bivalenti possa alterare le proteine di membrana che sono importanti per il mantenimento dell'architettura della parete cellulare (Weinstein *et al.*, 2006).

Gli agenti chelanti devono entrare in contatto diretto con la parete cellulare dei batteri per poter esplicare la loro funzione, quindi il volume di soluzione necessario varia in base alle dimensioni dell'utero. Si raccomandano dosi di 200 a 500 ml. Il legame dell'agente chelante con la parete batterica risulta in pochi minuti nella morte del microrganismo e nell'accumulo di detriti, quindi deve essere eseguito un lavaggio uterino entro 12 ore per rimuovere i sottoprodotti. La terapia attualmente raccomandata per il trattamento di gram negativi, funghi o lieviti prevede l'infusione uterina di 250-500 ml di tricide[®], o Tris-EDTA il primo giorno. Entro 24 ore si effettua un lavaggio uterino e si esamina il liquido recuperato. Se è torbido o presenta tracce di muco, l'agente chelante viene infuso di nuovo il secondo giorno. Il trattamento antibiotico viene

iniziato il terzo giorno, dopo l'irrigazione uterina, e continuato almeno per cinque giorni (LeBlanc, 2010).

Siccome i patogeni inducono differenti risposte uterine e hanno sviluppato metodi diversi per evadere la risposta immunitaria, trattamenti con mucolitici o agenti chelanti possono migliorare il successo del trattamento antibiotico. Alcuni patogeni batterici che invadono l'utero hanno la capacità di formare biofilm che conferisce antibiotico resistenza e contribuiscono al prolungamento dell'infiammazione cronica. I corticosteroidi possono essere utilizzati in alcune cavalle con accumulo di fluidi prima e dopo l'accoppiamento con l'intento di smorzare la risposta immunitaria conseguente alla deposizione del seme. (LeBlanc, 2010).

CONCLUSIONI

Il susseguirsi di eventi dell' infiammazione post coitale acuta sono ben conosciuti in tutti gli animali domestici. È importante ricordare che l' infiammazione post coitale è fisiologica e utile. Non andrebbe attenuata o trattata a meno che la fattrice non mostri chiari problemi di *clearance* uterina.

La produzione bibliografica sull' endometrite post coitale è abbondante e continua nel tempo, infatti nonostante questo fenomeno sia stato ampiamente studiato negli anni passati, è ancora un argomento di ricerca attuale, sia per le implicazioni economiche nella pratica della riproduzione equina, sia per gli elementi di novità che sono stati recentemente messi in luce e che necessitano di ulteriori approfondimenti.

Spesso però i risultati delle varie ricerche sono discordanti se pur effettuati parallelamente nel tempo. Questo dipende in parte dalla tipologia di animali coinvolti nella sperimentazione, che spesso può essere completamente diversa da un lavoro all'altro sia dal punto di vista dello stato fisiopatologico che della razza. Inoltre la valutazione delle fattrici è senza dubbio influenzata dall'esperienza dell'operatore, dalla frequenza delle visite e dalle caratteristiche delle attrezzature utilizzate. La fertilità è certamente il risultato dell'integrità dell'apparato riproduttore ma anche di molteplici fattori quali ad esempio l'alimentazione, il management e le caratteristiche di razza che difficilmente sono sovrapponibili nei diversi lavori, portando a volte a risultati divergenti.

Negli ultimi 30 anni le percentuali di fertilità non sono sostanzialmente cambiate. Nonostante tutte le ricerche e i nuovi protocolli utilizzati, ci sono ancora troppi fattori che non siamo in grado di controllare.

Per quanto riguarda gli studi futuri, le ricerche andrebbero rivolte alla seconda fase dell'infiammazione, e ai fenomeni che portano all' immunotolleranza verso il seme ed il prodotto del concepimento ed i conseguenti cambiamenti molecolari e cellulari nell' endometrio che facilitano l'impianto e lo sviluppo embrionale, il rimodellamento tissutale e

l' angiogenesi. Questo potrebbe permettere di spiegare meglio patologie quali la morte embrionale precoce e l' endometriosi.

Ulteriori sforzi andrebbero anche indirizzati nella comprensione intima dei meccanismi che portano alla compromissione della clearance uterina e nella diagnosi precoce della condizione di suscettibilità. Infatti i trattamenti classici con lavaggi uterini richiedono un gran dispendio di tempo e potrebbero essi stessi diventare causa di contaminazione uterina. Uno strumento che permetta di conoscere in anticipo lo stato di suscettibilità della fattrice sarebbe di grande aiuto, permettendo di concentrare le proprie energie solo su quelle fattrici che ne hanno effettivamente bisogno.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Adams A.A., C.C. Breathnach, M.P. Katepalli, K. Kohler, D.W. Horohov. 2008. Advanced age in horse affects divisional history of T-cell and inflammatory cytokine production. *Mechanism of ageing and development* 129: 656-664.
- Adams A.A., M.P. Katepalli, K. Kohler, S.E. Reedy, J.P. Stiliz, M.M. Vick, B.P. Fitzgerald, L.M. Lawrence, D.W. Horohov. 2009. Effect of body condition, body weight and adiposity on inflammatory cytokine responses in old horses. *Veterinary immunology and immunopathology* 127: 286-294.
- Adams G.P., J.P. Kastelic, D.R. Bergfelt, O.J. Ginther. 1987. Effect of uterine inflammation and ultrasonically detected uterine pathology on fertility in the mare. *Journal of reproduction and fertility supplement* 35: 445-454.
- Aguilar J., M. Hanks, D.J. Shaw, R. Else, E. Watson. 2006. importance of using garding techniques for the preparation of the endometrial cytology smears in mares. *Theriogenology* 66: 423-430.
- Albihn A., V. Båverud, U. Magnusson. 2003. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta veterinaria scandinavia* 44: 121-129.
- Alghamdi A. S., B.J. Lovaas, S.L. Bird, G.C.Lamb, A.K. Rendhal, P.C. Taube, D.N. Foster. 2009. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Animal reproduction science* 114: 331-344.
- Alghamdi A.S., D.N. Foster, M.H.T. Troedsson. 2004. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polimorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* 127: 593-600.
- Alghamdi A.S., e D.N. Foster. 2005. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophilextracellular traps. *Biology reproduction* 73: 1174-1181.
- Alghamdi A.S., M.H.T. Troedsson, T. Laschkewitsch, J.L. Xue. 2001. Uterine secretions from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology* 55: 1019-1028.

- Allen E.A. 1981. A cervical anomaly in arabian filly. *Equine veterinary journal* 13: 268-269.
- Allen W.E. 1991. Investigations into the use of exogenous oxytocin for promoting uterine drainage in mares susceptible to endometritis. *Veterinary research* 128: 593-594.
- Aloe S., F. Weber, B. Behr, C. Sauter-Louis, H. Zerbe. 2012. Modulatory effects of bovine seminal plasma on uterine inflammatory processes. *Reproduction in domestic animals* 47: 12-19.
- Asbury A.C., N.T. Gorman, G.W. Foster. 1984. Uterine defence mechanisms in the mare: serum opsonins affecting phagocytosis of streptococcus zooepidemicus by equine neutrophils. *Theriogenology* 21: 375-385.
- Asbury A.C., R.E.W. Halliwell, G.W. Foster, S.J. Longino. 1980. Immunoglobulins in uterine secretions of the mares with differing resistance to endometritis.
- Ashworth C.D., D.R. Nelson. 1990. Antimicrobial potentiation of irrigation solutions containing tris-(hydroxymethyl) aminomethane-EDT. *The journal of the american medical association* 197: 1513-1514. In LeBlanc M.M.. 2010. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in domestic animals* 45 (2): 21-27.
- Bae S.E., B.M. Corcoran, E.D. Watson. 2001. Immunohistochemical study of the distribution of adrenergic and peptidergic innervation in the equine uterus and cervix. *Reproduction* 122: 275-282.
- Ball B.A., S.J. Shin, W.H. Patten, D.H. Lein, G.L.Woods. 1988. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology* 29: 1269-1283 In Le Blanc M.M., J. Magsig, A.J. Stromberg. 2007. Use of low volume flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 68: 403-412.
- Barbacini S., D. Necchi, G. Zavaglia, E.L. Squires. 2003. Retrospective study on the incidence of postinsemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen. *Journal of equine veterinary science* 23: 493-496.

- Betteridge K.J., M.D. Eaglesome, D. Mitchell, P.F. Flood, R. Beriault. 1982. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of anatomy* 135: 191-209.
- Bindslev M.M., M.H. Villumsen, M.M. Petersen, I.B. Bogh, A.M. Bojesen. 2008. Genetic diversity of *S. Equi* ssp. *Zooepidemicus* and *E. coli* isolated from the reproductive tract of the mare. *Reproduction in domestic animals* 43: 110-111.
- Bischof R.J., C.S. Lee, M.R. Brandon, E. Meeusen. 1994. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. *Journal of reproduction immunology* 26:131-146.
- Bjorling D.E., R.E. Wooley. 1982. EDTA-tromethamine lavage as an adjunct treatment for multiple fistulas in a dog. *Journal of the American veterinary medical association* 181: 596-597. In LeBlanc M.M.. 2010. Advances in the diagnosis and tretment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in domestic animals* 45 (2): 21-27.
- Blue J.L., R.E. Wooley, R.G. Eagon. 1974. Treatment of experimentally induced *Pseudomonas aeruginosa* otitis externa in the dog by lavage with EDTA-tromethamine-lysozime. *Amercan journal of veterinary research* 35: 1221-1223. In LeBlanc M.M.. 2010. Advances in the diagnosis and tretment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in domestic animals* 45 (2): 21-27.
- Bracher V.,A. Neuschaefer, W.R.Allen. 1991. The effect of intra-uterine infusion of kerosene on the endometrium of mares. *Journal of reproduction and fertility supplement* 44: 706-707.
- Brinsko S.P., D.D. Varner, T.L. Blanchar ,S.A. Meyers. 1990. The effect of postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* 33: 465-475.
- Brinsko S.P., S.L. Rigby, D.D. Verner, J.L. Blanchard. 2003. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *Proceedings of 49th annual convention of the american association of equine practictioners*, 363-365, New Orleans, Louisiana, 21 november

2003. Available at
www.ivis.org/proceedings/AAEP/2003/brinsko2/chapter_frm.asp?LA=1

Brinsko S.P., T.L. Blanchard, D.D. Varner, J. Schumacher, C.C. Love. 2011. Endometritis. In Manual of equine reproduction. Brinsko S.P., T.L. Blanchard, D.D. Varner, J. Schumacher, C.C. Love, K.Hinrichs, D.L. Hartman, pp. 73-84. St Louis: Mosby/Elsevier.

Brown A.E., P.J. Hansen, A.C. Asbury. 1985. Oponization of bacteria by uterine secretions of cyclic mares. American journal of veterinary research 45: 1205-1208.

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

Burke M.S., J.M. Ragi, H.L. Karamanoukian, M. Kotter, G.F. Brisseau, D.S. Borowitz, M.E. Ryan, M.S. Irish, P.L. Glick. 2002. New strategies in non operative management of meconium ileus. Journal of pediatric surgery 37: 760-764.

Burleson M.D., M.M. LeBlanc, W.T. Riddle, K.E.M. Hendricks. 2010. Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in thoroughbred mares. In Evans M (ed.), proceedings international symposium of equine reproduction. Wiley-blackwell, Lexington, KY; S. 103.

Cadario M.E., A.M. Merrit, L.F. Archbald, W.W. Thatcher, M.M. LeBlanc.1999. Changes in intrauterine pressure after oxytocin administration in reproductively normal mares and in those with a delay in uterine clearance. Theriogenology 51: 1017-1025.

Cadario M.E., M.J.D. Tatcher, M.M. LeBlanc. 1995. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. Biology of reproduction monography 1: 495-500.

Campbell M.L.H., A.J. Bliss. 2010. A novel ultrasonographic method for mesuring cervical relaxation at different stages of estrous cycle in mares. Animal reproduction science 121: 84-85.

Card C. 2005. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. Theriogenology 64: 580-588.

- Causey R.C. 2006. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. *The veterinary journal* 172: 405-421
- Causey R.C. 2007. Mucus and the mare: how little we know. *Theriogenology* 68: 386-394.
- Causey R.C., P. Ginn, B. Katz, B. Hall, K.J. Anderson, M.M. LeBlanc. 2000. Mucus production of the endometrium of reproductively healthy mares and mares with delayed uterine clearance. *Journal of reproduction fertility suppl* 56: 333-339.
- Causey R.C., T. Militello, L. O' Donnel, S.K. Lyle, D.L. Paccamonti, K.J. Anderson, B.E. Eilts, S. Morse, M.M. LeBlanc. 2008. Pathologic effects of clinical uterine inflammation on the equine endometrial mucosa. Vol. 54. American association of equine practitioners, San Diego, pp.276-277.
- Chaykin S., J.G. Watson. 1983. Reproduction in mice: spermatozoa as factors in the development and implantation of embryos. *Gamete research* 7: 63-73.
- Christoffersen Mette, Elizabeth Woodward, Anders M. Bojesen, Stine Jacobsen, Morten R Petersen, Mats H.T. Troedsson e Henrik Lehn-Jensen. 2012. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent edometritis. *BMC Veterinary research* 8:41 [www.biomedcentral.com/1746-6148/8/41].
- Combs G.B., M.M. LeBlanc, L. Neuwirth, T.Q. Tran. 1996. Effect of prostaglandin F₂ α , clorprostenol and fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Theriogenology* 45: 1449-1455.
- Costerton J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Leppin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annual review of microbiology* 49: 711-745.
- Day W.E., J.W. Evans, M.M. Vogelsang, M.E. Westhusin. 1995. Characterization of the cervix in the cycling mare using ultrasound. *Biology of reproduction monography* 1: 519-526.
- De Borba E.V.C., G.C. Camozzato, E. Malschitzky, I.C. Bustamanthe-Filho, A.A. Martins, R.C. Mattos, A. P. Neves. 2012. Is the presence of uterine fluid a reliable indicator of endometrial inflammation? *LBH:6 Leipziger Tierärztekongress -Tagungsband* 2: 264-267.

- De Ruijter-Villani M., J.C. De Grauw, T.A.E. Stout. 2012. Post-breeding endometritis: effect of dexamethasone treatment on the expression of inflammatory markers. *LBH:6 Leipziger Tierärztekongress-Tagungsband 2*: 286-288.
- Donlan R.M., J.W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganism. *Clinical microbiology reviews* 15: 167-193.
- Doty A., W.C. Buhi, S. Benson, K.E. Scoggin, M. Pozor, M. Macpherson, M. Mutz, M.H.T.Troedsson. 2011. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. *Biology reproduction* 85: 157-164.
- Duru M., A. Nacar, Z. Yoden, G. Kuvandik, M.R. Helvacı, A. Koc, Y. Akaydin, H. Oksuz, S. Sogut. 2008. Protective effects of N-acetylcysteine on Cyclosporine-A-induced nephrotoxicity. *Renal failure* 30: 453-459.
- Estany S., J.R. Palacio, R. Barnadas, M. Sabes, A. Iborra, P. Martinez. 2007. Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and alpha-tocopherol on endometrial cells in culture. *Journal of reproduction immunology* 75: 1-10.
- Esteller- Vico A., I.K. Liu, S. Couto. 2012. Uterine vascular degeneration is present throughout the uterine wall of multiparous mares. Colinearity between elastosis, endometrial grade, age and parity. *Theriogenology* 78: 1078-1084.
- Esteller-Vico A., I.K.M. Liu, E.P. Steffey, M.E. Vaughan, R.J. Brosnan. 2007. Effect of vascular degeneration on utero-ovarian blood flow and perfusion in cyclic mare. *Theriogenology* 68: 506.
- Evans M.J., J.M. Hamer, L.M. Gason, C.S. Graham, A.C. Asbury, C.H.G. Irving. 1986. Clearance of bacteria and non antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. *Theriogenology* 26: 37-50.
- Farca A.M., P. Nebbia, G. Re. 1993. Potentiation of the in vitro activity of some antimicrobial agents against selected gram negative bacteria by EDTA-tromethamine. *Veterinary research communication* 17:77-84. In LeBlanc M.M.. 2010. Advances in the diagnosis and treatment of chronic

- infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in domestic animals* 45 (2): 21-27.
- Fiala S.M., C.A. Pimentel, A.L. Mattos, R.M. Gregory, R.C. Mattos. 2007. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology* 67: 556-562.
- Fiala S.M., C.A. Pimentel, K. Steiger, A.L.G. Mattos, R.M. Gregory, R.C. Mattos. 2002. Effect of skim milk and seminal plasma uterine infusions in mares. *Theriogenology* 58: 491-494.
- Flowers W.L., K.L. Esbenshade. 1993. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *Journal of reproduction and fertility supplement* 48: 217-228.
- Freeman K.P., J.F. Roszel, S.H. Slusher, M. Castro. 1990. Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions. *Theriogenology* 33: 799-808.
- Fumuso E.A., J. Aguilar, S. Giguère, M. Rivulgo, J. Wade, D. Rogan. 2007. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effect of immunomodulation. *Veterinary immunology and immunopathology* 118: 30-39.
- Galvão A., M.R. Rebordão, A.Z. Szóstek, D.J. Skarzynski, G. Ferreira-Dias. 2012. Netosis and cytokines in the equine endometrium: friends or foes? *LBH:6 Leipziger Tierärztekongress-Tagungsband 2*: 280-282.
- Gangnuss S., M.L. Sutton-McDowall, S.A. Robertson, D.T. Armstrong. 2004. Seminal plasma regulates corpora lutea macrophage populations during early pregnancy in mice. *Biology of reproduction* 71: 1135-1141.
- Gilbert R.O., M.H. Fales. 1996. The effect of bovine seminal plasma in the function and integrity of bovine neutrophils. *Theriogenology* 46: 640-658.
- Ginther O.J. 1992. *Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects*. 2nd ed. Equiservices, Winsconsin, USA.
- Gores-Lindolm A., S. Ahlschwede, R. Causey, M. Calderwood-Mays, M.M. LeBlanc. 2009. Effect of intrauterine infusion of diluted N-acetylcysteine on equine endometrium. *Proceedings of american association of equine practitioners*, vol 55. Las Vegas, Nevada. p. 326.

- Greenhoff G.R., R.M. Kenney. 1975. Evaluation of reproductive status of nonpregnant mare. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 167: 449-458.
- Güevenc K., T.Reilas, T. Katila. 2004. Effect of frozen semen on the uterus of mares with pathological uterine changes. *Reproduction Nutrition Development* 44: 243-250.
- Güevenc K., T.Reilas, T. Katila. 2005. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology* 44: 2504-2512.
- Gutjhar S., D.L. Paccamonti, J.F. Pycoc, M.A: Taverne, S.J. Dieleman, G.C. van der Weijden. 2000. Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mares. *Theriogenology* 54: 447-456.
- Hansen P.J. 2011. The immunology of early pregnancy in farm animals. *Reproduction in domestic animals* 46(suppl.3): 18-30.
- Hinrichs K., M.R. Cummings, P.L. Sertich, R.M. Kenney. 1988. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule and clitoral fossa of clinically normal mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193: 72-75.
- Huchzermeyer S.,A. Wehrend, H. Bastedt. 2005. Histomorphology of the equine cervix. *Anat hist embr* 34: 38-41.
- Hughes J.P., Loy R.G. 1969. Investigations on the effect of intrauterine inoculations of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. *Proceedings of American Association of Equine Practitioners* 15: 289-292. In Troedsson M.H.T. 2006. Breeding-induced endometritis in mare. *Veterinary Clinics Equine Practice* 22: 705-712.
- Hurgten J.P. 2011. Abnormalities of cervical and vaginal development. In McKinnon A.O., E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner. *Equine reproduction*. 2nd ed. Wiley-Blackwell; p.2719-2720.
- Hurtgen J.P. 2006. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology* 66: 560-566.
- Jain T.L., G.R. Saade, R.E. Garfield. 1999. Uterine contraction. In: E. Knobil and J.D. Neill (eds) *Encyclopedia of reproduction*, vol. 4, Academic press.

- Jasper M.J., K.P. Tremellen, S.A. Robertson. 2007. Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *Journal of reproduction immunology* 73: 74-84.
- Kaeoket K., E. Persson, A.M. Dalin. 2003. Influence of post-ovulatory insemination on sperm distribution, pregnancy and the infiltration by cells of the immune system, and distribution of CD2, CD4, CD8, and MHC class II expressing cell in the sow endometrium. *Journal of veterinary medicine*. 50: 169-178.
- Kana B.D., V. Mizrahi. 2010. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *FEMS immunology and medical microbiology* 58: 39-50.
- Kaplanski G., V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani, C. Farnarier. 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in immunology* 24: 25-29.
- Kasielski M., D. Novak. 2001. Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine* 95:448-456.
- Katila T. 1995. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology reproduction monography* 1: 515-517.
- Katila T. 1996. Uterine defence mechanism in the mare. *Animal reproduction science* 42: 197-204.
- Katila T. 1997. Neutrophils in uterine fluid after insemination with fresh live spermatozoa or with killed spermatozoa. *Pferdeheilkunde* 13: 540.
- Katila T. 2005. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. *Animal reproduction science* 89: 31-38.
- Katila T. 2008. What do we know about the susceptibility of mares to endometritis? *Pferdeheilkunde* 24: 61-65.
- Katila T. 2012. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reproduction in domestic animals* 47 (5): 31-41.

- Katila T., S. Sankari, O. Mäkelä. 2000. Transport of spermatozoa in the mare' s genital tract studied by a scintigraphic method . Journal of reproduction fertility 56: 571-578.
- Katila T., T.F. Lock, W.E. Hoffman, A.R. Smith. 1990. Lysozime, alkaline phosphatase, and neutrophils in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. Theriogenology 33: 723-732.
- Katila T.,M.M. Rivera del Alamo, E. Liepina, T. Reilas. 2012. The effect of cervical blockage on uterine inflammation after insemination. Pferdeheilkunde 23: 85-86.
- Kelly R.W., A.E. King, H.O. Critchley. 2001. Cytokine control in human endometrium. Reproduction 121: 3-19.
- Kenney R.M. 1978. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with note on early embryonic death. Journal of american veterinary medicine association 172: 241-262.
- Kenney R.M., P.A. Doig. 1986. Equine endometrial biopsy. In D.A. Morrow (ed.) Current therapy in theriogenology. W. Saunders, Philadelphia, PA, 723-729.
- Kirkland K.D., W.H. Fales, T.L. Blanchard, R.S. Youngquist, J.P. Hurgten. 1983. The in vitro effects of edta-tris, edta-tris-lysozime, and antimicrobial agents on equine genital isolates of *pseudomonas aeruginosa*. Theriogenology 20: 287-295.
- Klausch B., H. Kyank. 1972. Prostaglandins in gynecology and obstetrics. Zentralbl Gynäkol 94:705-719.
- Knudsen O. 1964. Partial dilatation of the uterus as a cause of sterility in the mare. The cornell veterinarian 54: 423-438.
- Kotilainen T., M. Huhtinen, T. Katila. 1994. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. Theriogenology 41: 629-636.
- Lagow E., M.M. De Souza, D.D. Carson. 1999. Mammalian reproductive tract mucins. Human reproduction update 5: 280-292.
- Langendijk P., E.G. Bouwman, N.M. Soede, M.A. Taverne, B. Kemp. 2002. Myometrial activity around oestrus in sows: spontaneous activity and effects of estrogens, clorprostenol, seminal plasma and clenbuterol. Theriogenology 57: 1563-1577.

- Langendijk P., N.M. Soede, B. Kemp. 2005. Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows. *Theriogenology* 63: 500-513.
- Le Blanc M.M. 2003. Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In B.A. Ball. *Recent advances in equine reproduction*. New York: international veterinary information service.
- Le Blanc M.M., J. Magsig, A.J. Stromberg. 2007. Use of low volume flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 68: 403-412.
- Le Blanc M.M., L. Neuwirth, L. Jones, C. Cage, D. Mauragis. 1998. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology* 50: 49-54.
- Le Blanc M.M., M.D. Burleson, W.T. Riddle, K.E.M. Hendricks. 2012. Endometrial pathogens are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in thoroughbred mares. *Pferdeheilkunde* 28: 86.
- LeBlanc M.M. e RC Causey. 2009. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduction in domestic animals* 44 (3): 10-22.
- LeBlanc M.M. 1994. Breakdown of uterine defence mechanisms in the mare: is a delay in physical clearance the culprit? *Proceedings of annual meeting of society for theriogenology, Kansas City, Missouri*, pp.121-129.
- LeBlanc M.M., L. Neuwirth, D. Maurgis, E. Klapstein, T. Tran. 1994a. Oxytocin enhance clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine veterinary journal* 26: 279-282.
- LeBlanc M.M., L. Neuwirth, A.C. Asbury, T. Tarn, D. Maurgis, E. Kalpstein 1994b. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine veterinary journal* 26: 109-113.

- LeBlanc M.M., R.D. Jonson, M.B. Calderwood Mays. 1995. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biology of reproduction monography* 1: 501-506
- LeBlanc M.M.. 2010. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in domestic animals* 45 (2): 21-27.
- LeBlanc. 2009. The current status of antibiotic use in equine reproduction. *Equine veterinary education* 21: 156-166.
- Lewis K., 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature rev micro*. January;(5): 48-56.
- Ley W.B., J.M. Bowen, D.P. Sponenberg, P.N. Lessard. 1989. Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology* 32: 263-276.
- Liepina E., V. Antane, M.M. Rivera de Alamo. 2010. Intrauterine fluid secretions in mares after artificial insemination. *Proceedings of 16th international science conference "research for rural development"*, Jelgava, Latvia, 2010, p. 12-16.
- Lieux P. 1970. Relationship between the appearance of the cervix and the heat cycle in mare. *Vet med / small animal clinician* 65(9):879-886.
- Liu I.K.M. e M.H.T. Troedsson 2008. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. *Theriogenology* 70: 415-420.
- Liu I.K.M., A. Esteller-Vico, S. Couto, G. Hirschbrunner, S. Aly. 2008. Assessment of equine endometrial and myometrial vascular elastosis: relationship to biopsy grade, age and parity. In Le Blanc M.M. (ed.), *The havemeyer foundation the chronically infertile mare*. The havemeyer foundation, Hilton head island, South Carolina, pp.11-12.
- Liu I.K.M., A.T.W. Cheug, E.M. Walsh, S. Ayin. 1986. The functional competence of uterine-derived polymorpho-nuclear neutrophils (PMN) from mares resistant and susceptible to uterine infection: a sequential migration analysis. *Biology of reproduction* 53: 1168-1174.

- Madill S., M.H.T. Troedsson, S.L. Alexander, N. Shand, E.M. Santschi, C.H.G. Irvine. 2000. Simultaneous recording of pituitary oxytocin secretion and myometrial activity in oestrus mares exposed to various breeding stimuli. *Journal of reproduction fertility* 56: 351-361.
- Morresey P.R. 2008. How to deliver respiratory treatments to neonates by nebulization. *Proceedings of american association of equine practitioners*, vol. 54 San Diego. pp.520-526.
- Newcombe J.R. 1978. Comparison of the bacterial flora of three sites in the genital tract of the mare. *Vet rec* 102: 169-170.
- Nie G.E., A. Barnes. 2003. Use of prostaglandin E1 to induce cervical relaxation in a maiden mare with post breeding endometritis. *Equine veterinary educational* 15:172-174.
- Nie G.J., K.E. Jhonson, J.G. Wenzel, T.D. Braden. 2003. Effect of administering oxytocin or clorprostenol in the periovulatory period on pregnancy outcome and luteal function in mares. *Theriogenology* 60: 1111-1118.
- Nielsen J.M. 2005. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 64: 510-518.
- Nielsen J.M., M.H.T. Troedsson, W.W. Zent. 2008. Results of bacteriological and cytological examination of the endometrium of mares in a practice in Denmark and in central Kentucky. In LeBlanc M.M. (ed.), *The havemeyer foundation*, Hilton head island, south California, p.34.
- Nikolakopoulos E. e E.D.Watson. 1999. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology* 52:413-423.
- Nikolakopoulos E., H. Kindahl, E.D. Watson. 2000. Oxytocin and PGF2 α release in mare resistant and susceptible to persistent mating-induced endometritis. *Journal of reproduction and fertility supplement* 56: 363-372.
- O W.S., H.Q. Chen, P.H. Chow. 1988. Effects of male accessory gland secretions on early embryonic development in the golden hamster. *Journal of reproduction and fertility* 84: 341-344.

- O' Leary S., D.T. Armstrong, S.A. Robertson. 2011. Transforming growth factor-beta (TGFbeta) in porcine seminal plasma. *Reproduction, fertility and development* 23: 748-758.
- O' Leary S., M.J. Jasper, G.M. Warnes, D.T. Armstrong, S.A. Robertson. 2004. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction* 128: 237-247.
- O' Leary S., M.J. Jasper, S.A. Robertson, D.T. Armstrong. 2006. Seminal plasma regulates ovarian progesterone production, leukocyte recruitment and follicular cell responses in the pig. *Reproduction* 132: 147-158.
- Otto M. 2006. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. *Current topics in microbiology and immunology* 306:251-258.
- Ozgen S., H. Schoon, H. Aupperle, H. Sieme, E. Klug. 2002. Ethio-pathogenesis of equine intrauterine fluid accumulation. *Pferdeheilkunde* 18: 594-599.
- Palm F., I. Walter, S. Budik, J. Kolodziejek, N. Nowotny, C. Aurich. 2008. influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and expression of IL-1 β , IL-6, TNF α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology* 70: 843-851.
- Papa F.O., C.M Melo, E.G. Fioratti, J.A. Dell' Aqua jr., F.S. Zahn, M.A. Alvarenga. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal reproduction science* 107: 293-301.
- Papa F.O., J.A. Dell' Aqua jr., M.A. Alvarenga, C.M Melo, F.S. Soares Zahn, M.D. Lopes. 2008a. The use of corticosteroid therapy on the modulation of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen semen. *Pferdeheilkunde* 24: 79-82.
- Peterson F.B., R.A. McFeely, J.S.E. David. 1969. Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare. *Proceedings of 15th ann. Conv. Am. ass. Equine practitioners*, pp279-287.
- Portus B.J., T. Reilas., T. Katila. 2005. effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equine veterinary journal* 37: 515-519.

- Pycock J.F. 1993. Cervical function and uterine fluid accumulation in mares. Proceedings of J.P. Hughes international workshop on equine endometritis. In Allen W.R. 1993. Equine veterinary journal 25: 193.
- Pycock J.F. 1994. A new approach to treatment of endometritis. Equine veterinary educational 6: 36-38.
- Pycock J.F. 2006. How to maximize the chances of breeding successfully from older maiden mare. Proceedings of American association of equine practitioners 52:245-249.
- Pycock J.F. 2009. Breeding management of the problem mare. In Equine breeding management and artificial insemination. Samper J.C., pp139-164. St Louis: Saunders Elsevier.
- Pycock J.F., J.R. Newcomb.1996. Assessment of the effect of three treatments to remove intruterine fluid on pregnancy rate in the mare. Veterinary research 138: 320-323.
- Quetin M., C. Beuke, E. Klug, H. Shoon, H. Aupperle, D. Shoon, H. Sieme. 2001. Effects of spermatozoa, seminal plasma and extender on post-breeding endometritis in mares. Pferdeheilkunde 17: 682-683.
- Rambags B.P.B. 2003. Early pregnancy loss in aged mares: probable causes and cures. Pferdeheilkunde 19:653-656.
- Rath D., H.J. Schuberth, P. Coy, U. Taylor. 2008. Sperm interactions from insemination to fertilization. Reproduction in domestic animals 43 (5): 2-11.
- Re G., P. Badino, A. Novelli, G.F. Di Renzo, L. Severino, M. De Liguoro, M.R. Ferone. 1995. Distribution of cytosolic oestrogen and progesterone receptors in the genital tract of the mare. Research in veterinary science 59: 214-218.
- Reiffsteck A., L. Dehennin, R. Sholler. 1982. Estrogens in seminal plasma in human and animal species: identification and quantitative estimation by gas chromatography-mass spectrometry associated with stable isotope dilution. Journal of steroid biochemistry 17: 567-572.
- Reilas T., A.M. Risco, M. Kareskoski, T. Katila. 2006. Effect of flunixin meglumine and oxytocin on uterine response to insemination in mares. Animal reproduction science. 94:252-253.

- Reilas T., M. Ristiniemi, T. Katila. 1998. Influence of hormone replacement therapy and bacterial inoculation on proteins and enzymes in uterine lavage fluid of ovariectomized mares. *Reproduction in domestic animals* 33: 11-19.
- Reilas T., T. Katila, O. Mäkelä, M. Huhtinen, E. Koskinen. 1997. Intrauterine fluid accumulation in oestrus mares. *Acta veterinaria scandinavica* 38: 69-78.
- Reitzenstein M. von, M.A. Callahan, P.J. Hansen, M.M. LeBlanc. 2002. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. *Theriogenology* 58: 887-898.
- Rhodes M., J.H. Brendemuhl, P.J. Hansen. 2006. Litter characteristics of gilts artificially inseminated with transforming growth factor-beta. *American journal of reproductive immunology* 56: 153-156.
- Riddle W.T., M.M. LeBlanc, A.J. Stromberg. 2007. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice. *Theriogenology* 68: 395-402.
- Riera F.L., K. Hinrichs, P.R. Hunt, R.M. Kenney. 1989. Cervical hyperplasia with prolapse in a mare. *Journal of the american veterinary medical association* 195: 1393-1394.
- Rigby S., J. Hill, C. Miller, J. Thompson, D. Varner, T. Blanchard. 1999. Administration of oxytocin immediately after insemination does not improve pregnancy rates in mares bred by fertile or subfertile stallions. *Theriogenology* 51:1143-1150
- Rigby S.L., R. Barhoumi, R.C. Burghardt, P. Colleran, J.A. Thompson, D.D. Varner, T.L. Blanchard, S.P. Brinsko, T. Taylor, M.K. Wilkerson, M.D. Delp. 2001. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biology of reproduction* 65:740-747.
- Robertson S.A. 2007. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *Journal of animal science* 85 (E): 36-44.
- Rodríguez-Martínez H., F. Saravia, M. Wallgren, E.A. Martínez, I. Sanz, J. Roca, J.M. Vasquez, J.J. Calvete. 2010. Spermadhesin PSP-I/PSP-II

- heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *Journal of reproductive immunology* 84: 57-65.
- Rozeboom K.J., G. Rocha-Chavez, M.H.T. Troedsson. 2001. Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating post breeding inflammation in sows. *Reproduction* 121: 567-572.
- Rozeboom K.J., M.H.T. Troedsson, T.W. Molitor, B.G. Crabo. 1999. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *Journal of animal science* 77: 2201-2206.
- Rozeboom K.J., M.H.T. Troedsson, H.H. Hodson, G.C. Shurson, B.G. Crabo. 2000. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *Journal of animal science* 78: 443-448.
- Rubtsov Y.P., A.Y. Rudensky. 2007. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nature reviews immunology* 7: 443-453.
- Rutlant J., M. Lopez-Bejar, F. Lopez-Gatius. 2005. Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: a review. *Reproduction in domestic animals* 40: 79-86.
- Samper J.C. 2009. Uterine edema in the mare. In: Samper J.C. (ed.), *Equine breeding management and artificial insemination*. Saunders Elsevier, St Louis, pp.133-138.
- Schoon D., Schoon H-A, Klug E., 1999. Angioses in the equine endometrium-Pathogenesis and clinical correlations. *Pferdeheilkunde* 15: 541-546.
- Schuberth H.J., U. Taylor , H. Zerbe , D. Waberki , R. Hunter , D. Rath. 2008. Immunological responses to semen in the female genital tract.. *Theriogenology* 70: 1174-1181.
- Scott M.A. 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal reproduction science* 60: 337-348.
- Sertich P.L. 2011. Cervix adhesions. In McKinnon A.O., E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner. *Equine reproduction*. 2nd ed. Wiley-Blackwell; p. 2721-2723.

- Sharpe K.L., H. Eiler, F.M. Hopkins. 1988. Absence of uterokinetic effects of prostaglandin F₂ α on oxytocin-reactive uterus in the mare. *Theriogenology* 30: 887-892.
- Sieme H., A. Bonk, H. Hamann, E. Klug, T. Katila. 2004. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology* 62: 915-928.
- Signoret J.P., F. Du Mesnil du Buisson, P. Mauleon. 1972. Effect of mating on the onset and duration of ovulation in the sow. *Journal of reproduction fertility* 31: 327-330.
- Sinnemaa L., T. Järvimaa, N. Lehmonen, O. Mäkela, T. Reilas, S. Sankara, T. Katila. 2005. Effect of insemination volume on uterine contractions and inflammatory response and on elimination of semen in the mare uterus – scintigraphic and ultrasonographic studies. *Journal of veterinary medicine A* 52: 466–471.
- Soto S.M., A. Smithson, J.P. Horcajada, J.A. Martinez, J.P. Mensa, J. Vila. 2006. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology and infection* 12: 1034-1036.
- Sparks T.A., Kemp D.T., R.E. Wooley, P.S. Gibbs. 1994. Antimicrobial effect of combination of EDTA-Tris and amikacin or neomycin on the microorganisms associated with otitis externa in dogs. *Vet res commun* 13: 516-520. In LeBlanc M.M.. 2010. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in domestic animals* 45 (2): 21-27.
- Taylor N.J. 1982. Investigation of sperm-induced cervical leukocytosis by a double mating study in rabbits. *Journal of reproduction fertility* 66: 157-160.
- Taylor U., D. Rath, H. Zerbe, H.J. Shuberth. 2008. Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. *Reproduction in domestic animals* 43: 166-175.
- Taylor U., H.J. Shuberth, D. Rath, H.W. Michelmann, C. Sauter-Louis, H. Zerbe. 2009a. Influence of inseminate componentson porcine leukocyte

- migration in vitro after pre- and post- ovulatory insemination. *Reproduction in domestic animals* 44: 180-188.
- Tibary A. 2011. Failure to dilate. In McKinnon A.O., E.L. Squires, W.E. Vaala, D.D. Varner. *Equine reproduction*. 2nd ed. Wiley-Blackwell; p.2724-2730.
- Tizard I.R. 1996. *Veterinary immunology. An introduction*. WB Saunders Company, Pennsylvania, USA.
- Töpfer-Petersen E., D. Waberski, O. Hess, S. Bellair, A. Shambony, M. Ekhlesi-Hundrieser, M. Gentzel, A. Reineke. 1998. Bedeutung des seminalplasmas für die befruchtung – ein kurzer Überblick (The role of seminal plasma in fertilization - a short overview). *Tierärztl umschau* 53: 447-454.
- Traub-Dargatz J.L., M.D. Salman, J.L. Voss. 2001. Medical problem of adult horses, as ranked by equine practitioners. *Journal of American veterinary association* 198: 1745-1747.
- Troedsson M.H., M.A. Scott, I.K. Liu. 1995. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. *American journal of veterinary research* 56: 468-472.
- Troedsson M.H.T. 1991. Uterine defense mechanism in the mare. Ph.D. Thesis, University of California, Davis, USA.
- Troedsson M.H.T. 1999. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 52: 461-471.
- Troedsson M.H.T. 2006. Breeding-induced endometritis in mare. *Veterinary clinics equine practice* 22: 705-712.
- Troedsson M.H.T., A. Desvousges, A. S. Alghamdi, B. Dahms, C.A. Dow, J. Hayna, R. Valesco, P.T. Collahan, M.L. Macpherson, M. Pozor e W.C. Buhi. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal reproduction science* 89: 171-186.
- Troedsson M.H.T., E.M. Woodward. 2012. Breeding-induced endometritis (BIE). *Leipziger Blaue Hefte* 24, 249-252.
- Troedsson M.H.T., I.K.M. Liu, M. Ing, J. Pascoe, M. Thurmond. 1993. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an

- intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Journal of reproduction and fertility* 99: 307-313.
- Troedsson M.H.T., I.K.M. Liu, B.G. Crabo. 1998. Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology* 49: 905-915.
- Troedsson M.H.T., K. Closet, A.S Alghamdi, B. Dahms, B.G. Crabo. 2001. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal reproduction science* 68: 273-278.
- Tunón A.M. 1999. The endometrium of the gynaecologically healthy mare during oestrus. A clinical, morphological chemical and immunological study. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural sciences, Uppsala, Sweden.
- Tunón A.M., H. Rodriguez-Martinez, C. Hultén, A. Nummijärvi, U. Mgnusson. 1998. Concentrations of total protein, albumin and immunoglobulins in undiluted uterine fluid of gynecologically healthy mares. *Theriogenology* 50: 821-831.
- Tunón A.M., T. Katila, U. Magnusson, A. Nummijärvi and H. Rodriguez-Martinez. 2000. T-cell distribution in two different segments of the equine endometrium 6 and 48 hours after insemination . *Theriogenology* 54:835-841.
- Tyler K.R. 1977. Histological changes in the cervix of the rabbit after coitus. *Journal of reproduction and fertility* 49: 341-345.
- Vandaele H., P. Daels, S. Piepers, M.M. LeBlanc. 2010. The effect of post-insemination dexamethasone treatment on pregnancy rates in mares. *Animal reproduction science* 121S: 110-112.
- Viring S., S. Einarsson. 1980. Effect of boar seminal plasma on uterine and oviductal motility in oestrus gilts. *Acta veterinaria scandinavia* 21: 607-616.
- Waberski D., H. Kremer, N.G. Borchardt, P.W. Jungblut, E. Kallweit, K.F. Weitze. 1999. Studies on a local effect of boar seminal plasma on ovulation time in gilts. *Zentralbl veterinarmed A* 46: 431-438.
- Waberski D., R. Claassen, T. Hahn, P.W. Jungblut, N. Parvizi, E. Kallweit, K.F. Weitze. 1997. LH profile and advancement of ovulation after

- transcervical infusion of seminal plasma at different stages of oestrus in gilts. *Journal of reproduction fertility* 109: 29-34.
- Waelchli R.O., M. Känzing, M. Döbeli, P. Rüş. 1994. Condition of the uterine cervix in relation to cycle stage, plasma progesterone and estradiol-17. *Reproduction in domestic animals* 29: 404-410.
- Walker C. 2008. Biofilms, what are they, and why should you know about them. In Le Blanc M.M. (ed.), *The havemeyer foundation the chronically infertile mare*. The havemeyer foundation, Hilton head island, South Carolina, pp.30-31.
- Walter J., C. Klein, A. Weherend. 2012. Distribution of mast cells in vaginal, cervical and uterine tissue of non-pregnant mares: Investigations on correlations with ovarian steroids. *Reproduction in domestic animals*. 47: 29-31.
- Washburn S.M., P.H. Klesius, V.K. Ganjam, B.G. Brown. 1982. Effect of estrogen and progesterone on the phagocytic response of ovariectomized mares infected in utero with β -hemolytic streptococci. *American journal of veterinary research* 43:1367-1370.
- Watson E., S. Barbacini, B. Berrocal, O. Sheerin, V. Marchi, G. Zavaglia, D. Necchi. 2001. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. *Theriogenology* 56:123-131.
- Watson E.D., C.R. Stokes, F.J. Boume. 1987a. Influence of arachidonic acid metabolites in vitro and in uterine washings on migration of equine neutrophils under agarose. *Research in veterinary science*. 43: 203-207.
- Watson E.D., C.R. Stokes, F.J. Boume. 1987b. Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Veterinary immunology and immunopathology* 16: 107-121.
- Watson E.D., C.R. Stokes, F.J. Boume. 1987c. Influence of administration of ovarian steroids on the function of neutrophils isolated from the blood and uterus of ovariectomized mares. *Journal of endocrinology* 112: 443-448.
- Watson E.D., C.R. Stokes, F.J. Boume. 1988. Influence of ovarian steroids on adherence (*in vitro*) of *streptococcus zooepidemicus* to endometrial epithelial cells. *Equine veterinary journal* 20: 371-372.

- Watson E.D., E. Nikolakopoulos, C. Gilbert, J. Goode. 1999. Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. *Theriogenology* 51: 855-865.
- Watson Elain D. 2000. Post-breeding endometritis in the mare. *Animal reproduction science* 60-61: 221-232.
- Weherend A., S. Huchzermeyer, H. Bastedt. 2005. Distribution of eosinophils and mast cell in the cervical tissue of non-gravid mares during dioestrus. *Reproduction in domestic animals* 40: 562-563.
- Weinstein W.L., P.A. Moore, S. Sanchez, U.M. Dietrich, R.E. Wooley, B.W. Ritchie. 2006. In vitro efficacy of a buffered chelating solution as an antimicrobial potentiator for antifungal drugs against fungal pathogens obtained from horses with mycotic keratitis. *American journal of veterinary research* 67: 562- 568.
- Weller P.H., J. Williams. 1986. Clinical features, pathogenesis and management of meconium ileus equivalent. *Journal of the royal society of medicine* 79: 36-37.
- Wiggins R., S.J. Hicks, P.W. Soothill, M.R. Millar, A.P. Corfield. 2001. Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sexually transmitted infections* 77:402-408.
- Williamson P., S.J.M. Munyua , R. Martin, J. Penhale. 1987. Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. *Journal of reproduction fertility supplement* 35: 317-325.
- Williamson P., S.J.M. Munyua , R. Martin, J. Penhale. 1989. Endometritis in the mare: a comparison between reproductive history and uterine biopsy as a techniques for predicting susceptibility of mares to uterine infections. *Theriogenology* 32: 351-357.
- Witte T.S., E. Melkus , I. Walter , B. Senge, S. Schwab, C. Aurich e W. Heuwieser. 2012. Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in estrous mares. *Theriogenology* 78: 1199-1208.

- Wolf C.A., E. Malschitzky, I.C. Bustamante-Filho, M.I.M. Jobim, R.C. Mattos. Uterine nitric oxide levels in susceptible mares after corticotherapy. LBH:6 Leipziger Tierärztekongress-Tagungsband 2: 289-292.
- Wooley R.E., A.P. Berman, E.B. Shotts Jr. 1979. Antibiotic-tromethamine-EDTA lavage for the treatment of bacterial rhinitis in a dog. The journal of the american medical association 175: 817-818. In LeBlanc M.M.. 2010. Advances in the diagnosis and tretment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. Reproduction in domestic animals 45 (2): 21-27.
- Wooley R.E., W.D. Shall, R.G. Eagon, T.A. Scott. 1974. Efficacy of EDTA-trs-lysozime lavage in the treatment of experimentally induced *pseudomonas aeruginosa* cystitis in the dog. American journal of veterinary research 35: 27-29. In LeBlanc M.M.. 2010. Advances in the diagnosis and tretment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. Reproduction in domestic animals 45 (2): 21-27.
- Young D., T. Hussel, G. Dougan. 2002. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. Nat immunol 3: 1026-1032.
- Zent W.W., M.H.T. Troedsson, J.L. Xue. 1998. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of thoroughbred mares: a field study. Proceedings of American association of equine practitioners 44: 64-65. In Troedsson M.H.T. 2006. Breeding-induced endometritis in mare. Veterinary clinics equine practice 22: 705-712.
- Zuin R., A. Palamidese, R. Negrin, L. Catozzo, A. Scarda, M. Balbinot. 2005. High-dose N-acetylcysteine in patients with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Clinical drug investingation 25: 401-408.

