

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA APÓS INFUSÃO DE
PROSTAGLANDINA E1 (MISOPROSTOL) PRÉ-INSEMINAÇÃO
OU IMEDIATAMENTE APÓS COLETA DE EMBRIÃO EM ÉGUAS
DOADORAS COMERCIAIS

GABRIELLE BUENO DE ALMEIDA GONÇALVES AMORIM

Botucatu - SP

Maio, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA APÓS INFUSÃO DE
PROSTAGLANDINA E1 (MISOPROSTOL) PRÉ-INSEMINAÇÃO
OU IMEDIATAMENTE APÓS COLETA DE EMBRIÃO EM ÉGUAS
DOADORAS COMERCIAIS

Dissertação apresentada junto ao
programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção do
título de Mestre.

Gabrielle Bueno de Almeida Gonçalves
Amorim

Orientador: Igor Frederico Canisso

Botucatu - SP
Maio, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Amorim, Gabrielle Bueno de Almeida Gonçalves. Resposta
inflamatória uterina após infusão de prostaglandina E1 (misoprostol)
pré-inseminação ou imediatamente após coleta de embrião em éguas
doadoras comerciais. / Gabrielle Bueno de Almeida Gonçalves Amorim.
- Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Igor Frederico Canisso
Capes: 50504002

1. Éguas. 2. Útero - Inflamação. 3. Endometrite.
4. Fertilidade. 5. Falópio, Trompas de. 6. Prostaglandinas.

Palavras-chave: Éguas; Endometrite; Fertilidade; Prostaglandinas;
Tubas uterinas.

Nome do Autor: Gabrielle Bueno de Almeida Gonçalves Amorim

Título: Resposta Inflamatória Uterina Após Infusão De Prostaglandina E1 (Misoprostol) Pré-Inseminação Ou Imediatamente Após Coleta De Embrião Em Éguas Doadoras Comerciais.

Comissão examinadora

Prof. Dr. Igor Frederico Canisso

Orientador, DVM, MSc, PhD, Dipl. ACT, Dipl. ECAR, Professor Associado

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Profa. Dra. Camila de Paula Freitas Dell Aqua

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Mestre e Doutor em Reprodução Animal - Unesp/Botucatu

Data da defesa: 03/05/2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de ter realizado esse mestrado e nos ter dado saúde e forças para combater um bom combate.

Agradeço aos meus maravilhosos pais por todo o apoio, cuidado, ajuda, orações e amor para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu esposo amado, Odilon Marquez, por sempre estar ao meu lado, me dando forças e coragem, cuidando de mim e buscando sempre o melhor para nós e para nossa família.

À minha família: minhas avós “Dudinha” e Aida, meu irmão Guilherme, meus tios e todos os meus familiares pelas orações e palavras de carinho.

Aos meus sogros Odilon e Marta por toda a ajuda, incentivo, orações e cuidado.

A todos os meus amigos que, mesmo na distância física e na falta de tempo, se fazem presentes em minha vida (por medo de esquecer alguém, não listarei nomes).

Um agradecimento especial à minha amiga querida, Andrezza Tafner, que cuidou dos meus gatinhos (Tita e Bostico) com tanto carinho e cuidado durante o período em que estivemos fora.

Agradeço ao Dr Igor Canisso que nos orientou durante esse mestrado. E pela oportunidade em ter aprendido muito na Universidade de Illinois ao final da minha graduação.

Ao Lorenzo Segabinazzi pelos conselhos e ajuda desde o início do projeto.

Aos meus queridos professores Simone Perecmanis e Rodrigo Arruda, da Universidade de Brasília, por nos acolherem com tanto carinho e abrirem as portas da universidade para que pudéssemos tocar os projetos.

Aos colegas do laboratório de microbiologia da UnB por todo o ensinamento e ajuda ao longo do último ano.

A instituição “Faculdade Estadual Paulista - UNESP” pela oportunidade que me foi concedida para realizar o curso de mestrado.

Agradeço, também, à professora Ana Liz por toda a ajuda desde o início do programa, mesmo diante da pandemia.

Aos professores Cezinande de Meira, Marco Alvarenga, José Dell Aqua e Lígia Silveira da Mota por nos tratarem sempre com carinho e atenção e estarem dispostos a nos ajudar.

Foi, sem dúvida, um período marcado por grandes desafios, pois todo o programa foi realizado durante a pandemia do COVID; mas agradeço a todos os que tornaram esse mestrado possível.

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

MUITO OBRIGADA! QUE DEUS ABENÇOE A TODOS!

AMORIM, G.B.A.G. **Resposta inflamatória uterina após infusão de prostaglandina E1 (misoprostol) pré-inseminação ou imediatamente após coleta de embrião em éguas doadoras comerciais.** Botucatu, 2022. 48p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta inflamatória e potenciais reações sistêmicas após a administração intrauterina de misoprostol, seja antes da inseminação ou imediatamente após a coleta de embrião. Éguas doadoras de embriões de propriedade privada (n=11) tiveram seus ciclos designados aleatoriamente para receber infusões de misoprostol (200 µg + 3mL de solução de Ringer com lactato) ou controle (3 mL de solução de Ringer com lactato), depositados bilateralmente na ponta dos cornos uterinos, pelo menos 72h pré inseminação (experimento 1) ou imediatamente após coleta de embrião (experimento 2). Cada égua teve um ciclo para misoprostol e controle em ambos os experimentos e um ciclo de reprodução (sem controle ou misoprostol) entre os experimentos. Edema uterino, acúmulo de líquido e número de polimorfonucleares foram avaliados antes de cada infusão e depois, diariamente, por 72h. Lavagem uterina foi realizada no dia seguinte a cada infusão em todos os grupos e experimentos. A ovulação foi induzida com um agonista de GnRH e confirmada em intervalos de 24h. As éguas foram inseminadas com sêmen de seis garanhões. As coletas de embrião foram realizadas entre 8 a 9 dias após a ovulação. Em ambos os experimentos, o misoprostol não afetou o edema uterino ou o acúmulo de líquido ($P>0,05$). No entanto, ambas as infusões simuladas e de misoprostol aumentaram o número de PMN até 48h pós-infusão em ambos os experimentos. As recuperações de embriões foram semelhantes entre os ciclos controle (45%, 5/11) e misoprostol nos experimentos 1 (45%, 5/11; $P>0,05$) e 2 (controle, 68%, 7/11; misoprostol, 45%, 5 /11; $P>0,05$). Em conclusão, o misoprostol não induziu inflamação uterina exacerbada em éguas ou reações adversas sistêmicas quando infundido antes da inseminação ou imediatamente após a coleta de embrião.

Palavras-chave: Endometrite equina; infertilidade; prostaglandina E-1; tuba uterina.

AMORIM, G.B.A.G. **Uterine inflammatory response after prostaglandin E1 (misoprostol) infusion pre-breeding or immediately after embryo flushing in commercial donor mares.** Botucatu, 2022. 48p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study aimed to assess the inflammatory response and potential systemic reactions after uterine administration of misoprostol, either during pre-breeding or immediately after post-embryo flushing. Privately owned embryo donor mares (n=11) were randomly assigned in a crossover design to receive misoprostol (200 µg + 3 mL of lactate Ringer's solution) or sham (3 mL of lactate Ringer's solution) infusions, bilaterally deposited via deephorn, at least 72h pre-breeding (experiment 1) or immediately after embryo flushing (experiment 2). Each mare had one cycle for misoprostol and sham in both experiments and a breeding cycle (no sham or misoprostol) between experiments. Uterine edema, fluid accumulation, and the number of uterine PMN were assessed before each infusion and then daily for 72h. Uterine lavage was performed the day after each infusion across groups and experiments. Ovulation was hastened with a GnRH agonist and confirmed at 24h-intervals. Mares were bred with semen from six stallions. Embryo flushing was performed 8- to 9-d post-ovulation. In either experiment, misoprostol did not affect uterine edema or fluid accumulation ($P>0.05$). However, both the sham and misoprostol infusions increased the number of PMN up to 48h postinfusion in both experiments. Embryo recoveries were similar between sham (45%, 5/11) and misoprostol cycles in experiments 1 (45%, 5/11; $P>0.05$) and 2 (sham, 68%, 7/11; misoprostol, 45%, 5/11; $P>0.05$). In conclusion, misoprostol did not induce exacerbated uterine inflammation in mares or systemic adverse reactions when infused pre-breeding or immediately after embryo flushing.

Keywords: Equine endometritis; infertility; prostaglandine E-1; uterine tube.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Anatomia e fisiologia da tuba uterina.....	3
2.2. Tuba uterina: obstrução e outras afecções.....	5
2.3. Técnicas de desobstrução da tuba uterina.....	6
2.4. Misoprostol.....	8
2.4.1. Farmacologia.....	8
2.4.2. Aplicabilidade geral.....	9
2.4.3. Efeitos na reprodução equina.....	9
2.5. Endometrite.....	10
2.5.1. Endometrite bacteriana aguda.....	13
2.5.2. Endometrite bacteriana crônica.....	13
2.5.3. Métodos diagnósticos: citologia e cultura uterinas.....	13
2.5.4. Tratamentos.....	14
3. CONCLUSÃO.....	16
4. REFERÊNCIAS.....	17
HIPÓTESE.....	25
OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO 2.....	26
ARTIGO - Uterine inflammatory response after misoprostol during estrus and diestrus in commercial embryo donor mares.....	27

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A trompa de Falópio, também chamada de tuba uterina ou oviduto, é um órgão tubular composto por camadas fibromusculares que possui funções específicas nos eventos reprodutivos, como transporte e capacitação de espermatozoides, transporte oocitário, maturação final dos gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (Avilés et al. 2015; Ball, 1993; Ellinger et al. 1974; Jansen, 1984; Ortis et al. 2013; Zent et al. 1993).

De acordo com Tsutsumi et al. (1979), a junção ampola-istmo-tubária pode ficar parcial ou totalmente obstruída por uma massa gelatinosa levando à potencial infertilidade. A obstrução da tuba uterina é considerada uma das diversas causas de infertilidade em éguas.

Ao longo dos anos, algumas técnicas foram desenvolvidas com a intenção de desbloquear as tubas uterinas, como: a aplicação de prostaglandina E2 na superfície da papila útero-tubária por histeroscopia; lavagem das trompas de Falópio ou aplicação laparoscópica de PGE2 (Allen et al. 2006; Ortis et al. 2013; Pye et al. 2018; Zent et al. 1993); hidrocanulação da tuba uterina via histeroscopia (Scoggin, 2021 e Inoue, 2013) e, mais recentemente, o uso do misoprostol infundido na ponta do corno com pipeta longa flexível (Alvarenga et al. 2018).

Ellinger et al. (1974) comentou a ação das prostaglandinas na contratilidade da musculatura lisa da tuba uterina, pois se comporta de forma variável na presença de um embrião ou de um oócito não fertilizado (Weber et al. 1993; Freeman et al. 1992; Oguri et al. 1972), visto que, o transporte embrionário só ocorre após liberação de prostaglandina E2 pelo embrião. Weber et al. (1993) relatou que a administração de PGE2 no lúmen tubário resulta em um transporte não seletivo de embriões, oócitos não fertilizados e massas tubárias.

O misoprostol, um análogo sintético da prostaglandina E1, tem sido utilizado não apenas no tratamento de úlceras gástricas em humanos (Garris et al. 1989; Agrawal et al. 1985); mas também na prática ginecológica e obstétrica, pois promove contração uterina e relaxamento cervical (Tang et al. 2007) e facilita a drenagem uterina (Brinsko et al. 2011). Outras aplicações clínicas incluem a indução do aborto e a contenção de hemorragia pós-parto em humanos.

Nos últimos anos, a administração de misoprostol ganhou popularidade na prática de reprodução equina (Alvarenga et al. 2018) por melhorar os índices de recuperação

embrionária de éguas que apresentam subfertilidade sem causa aparente. No entanto, uma resposta inflamatória uterina exacerbada pós-infusão do fármaco ainda não foi criticamente analisada.

A endometrite, também conhecida como resposta inflamatória uterina, é normalmente fisiológica e visa limpar o útero contra bactérias, plasma seminal, excesso de espermatozoides e detritos (Canisso et al. 2016; LeBlanc et al. 2009). Após infusão intrauterina de sêmen ou de algum fármaco, ocorre aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e conseqüentemente ativação de neutrófilos polimorfonucleares como barreira de defesa fisiológica primária (Canisso et al. 2016). Éguas classificadas clinicamente como suscetíveis à endometrite, devido à dificuldade de limpeza uterina e acúmulo de líquido, podem apresentar uma resposta inflamatória exacerbada após a infusão. Por outro lado, éguas jovens e resistentes à endometrite, podem apresentar uma resposta inflamatória leve a moderada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia e fisiologia da tuba uterina

A trompa de Falópio, também chamada de tuba uterina ou oviduto (Figuras 1 e 2), é um órgão tubular composto por camadas fibromusculares (mesosalpinge, miosalpinge, endosalpinge e lúmen) (Croxatto, 2002; Jansen, 1984) que possuem funções específicas e fazem comunicação entre ovários e útero (Avilés et al. 2015). As fimbrias são os pontos de coleta e maturação de oócitos; e éguas apresentam poucas fimbrias ligadas diretamente ao ovário (Bennett, 2006), o que as difere das outras espécies. Já o istmo tem a função de armazenar os espermatozoides antes da ovulação e controlar capacitação e hiperativação para garantir eficiência da célula espermática (Desantis et al. 2009; Hunter, 2005); e a ampola é onde ocorre a fertilização, incubação e maturação do embrião inicial (Ball, 1993; Ortis et al. 2013). Zent et al. (1993) abordou a importância deste órgão nos eventos reprodutivos da maturação final dos gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial.

Figura 1. Tuba uterina: istmo (porção mais fina à esquerda) faz conexão direta com o útero, ampola (porção central), infundíbulo (porção mais espessa à direita) faz conexão com o ovário através das fimbrias.



Figura 2. Tuba uterina de potra mostrando conexão entre ponta de corno uterino (à direita) e ovário (à esquerda).



Bennett (2006) descreveu, ainda, que a tuba uterina da égua difere de outros mamíferos (mulheres e vacas) pelo fato de possuir uma espécie de musculatura que funciona como um esfíncter, também chamada de papila muscular na junção útero-tubária (Inoue et al. 2017), dificultando sua distensão em um quadro de salpingite, processo inflamatório da tuba uterina de etiologia multifatorial (Medenbach et al. 1999), ou dificultando procedimentos de cateterização por causar pressão reversa. A ausência da

papila em mulheres e vacas, facilita o diagnóstico e tratamento de afecções da tuba uterina (Inoue et al. 2017).

Jansen (1984) descreveu que a fisiologia da tuba uterina é dependente de hormônios. Em humanos, a noradrenalina foi descrita como a catecolamina que exerce mais influência sobre o sistema endócrino da tuba uterina. A ciliogênese é um processo estrógeno dependente e antagonista à progesterona. Jansen (1984) relatou a importância das prostaglandinas na contratilidade e dilatação da tuba uterina, mostrando os efeitos das prostaglandinas F2 α e E2 no estímulo à contratilidade muscular (Roth-Brandel et al. 1970) e aceleração no transporte oocitário. Pauerstein et al. (1968) descreveram que o estrógeno aumenta a frequência e amplitude da contratilidade da tuba uterina.

Hunter (2002) hipotetizou que junto com o oócito e células do cumulus oophorus, leucócitos, principalmente polimorfonucleares, podem ser liberados no momento da ovulação e serem fontes de citocinas, funcionando como tecido parácrino dentro da tuba uterina. O epitélio do oviduto foi descrito por Abe (1996) e consiste em dois tipos celulares: o ciliado, que atua no transporte dos gametas e o não-ciliado que tem função secretora de proteínas e glicoproteínas.

2.2. Tuba uterina - obstrução e outras afecções

A junção ampola-ístmotubária de éguas pode ficar parcial ou totalmente ocluída com uma massa gelatinosa composta por fibroblastos e fibras de colágeno tipo 1 (Alvarenga et al. 2018; Medenbach et al. 1999; Lantz et al. 1998) originada de células do oviduto, do *cumulus oophorus* e do fluido folicular podendo levar ao comprometimento da fertilidade (Tsutsumi et al. 1979), por dificultar o transporte espermático ao local de fertilização e a descida do embrião para o útero com 5 dias após a ovulação (Alvarenga et al. 2018). Betteridge et al. (1974) evidenciaram a retenção de oócitos não fertilizados no oviduto por meses. Arnold et al. (2013) evidenciaram a presença de “plugs” ou massas intraluminais no oviduto de éguas como limitação na função do órgão, contribuindo para subfertilidade ou infertilidade.

De acordo com Bennett (2006), antes de suspeitar de uma possível obstrução de tuba uterina, é importante que seja realizado um exame reprodutivo completo da égua (exame ultrassonográfico, cultura e citologia uterinas, biopsia endometrial, análises hormonais e histeroscopia) para que outras causas de infertilidade sejam descartadas.

Achatamento ou tecido cicatricial na papila útero-tubária, alterações na junção útero tubária (cistos, aderência e fibrose), salpingite e distúrbios nas interações fimbria-

ovário (tumores, aderências e hematomas) são consideradas alterações que podem afetar a fertilidade da égua (Bennett, 2006). Cistos ou aderências na região fimbria-ovário podem inviabilizar a captação de oócitos pelas fímbrias para o oviduto, comprometendo a fertilização.

2.3. Técnicas de desobstrução da tuba uterina

Allen et al. (1979) e Parker et al. (1998) descreveram técnicas que avaliaram a permeabilidade tubária. O teste de grânulos de amido foi primeiramente descrito por Allen et al. (1979) e consistia de uma abordagem cirúrgica por laparoscopia onde eles depositavam grânulos de amido na superfície do ovário e então, procuravam recuperar do útero, 24h após tratamento. Já o trabalho de Parker et al. (1998) consistiu em uma deposição de microesferas fluorescentes no ovário, utilizando probe e agulha de aspiração folicular por via vaginal, e após 24h e 48h, realizavam lavados uterinos para recuperação das esferas. Ambas técnicas apresentavam limitação em ter somente efeito diagnóstico da obstrução de tuba uterina. Além de serem onerosos, consistiam de procedimentos invasivos, por trazerem riscos de peritonite e morte do animal.

A laparotomia de flanco e a laparoscopia foram descritas por Fialho et al. (2001) como sendo técnicas que auxiliam na melhora dos índices reprodutivos de várias espécies por permitir transferência cirúrgica de embrião, transferência intratubária de gametas e inseminação no oviduto.

A técnica de laparoscopia apresenta vantagens na redução da dor pós-operatória, melhora na cicatrização da ferida e recuperação do animal, reduzindo o risco de infecções (Shettko et al. 2021). Mas possui limitação devido à anatomia do trato reprodutivo, por dificuldade de acesso e manipulação do oviduto (Inoue et al. 2017). É importante considerar a laparoscopia uma técnica invasiva por apresentar complicações como peritonite séptica, aderências, hemorragias, punção intestinal, esplênica ou vascular e complicações incisionais, trazendo riscos à vida do animal. Um preparo pré cirúrgico bem feito, incluindo jejum de 24h, é essencial para um procedimento mais eficaz e seguro, segundo Fialho et al. (2001). Checura et al. (2020) descreveram que a técnica de infusão de PGE na tuba uterina por via laparoscópica é cara e não apresenta vantagens na recuperação precoce de embriões para criopreservação. Já Köllmann et al. (2011) descreveram a técnica de lavagem da tuba uterina por laparoscopia, como uma técnica de prático diagnóstico e terapia de distúrbios do oviduto, além de facilitar a coleta de embriões pequenos direto da tuba e a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT).

Thurmond et al. (2000) descreveram a técnica de cateterização para salpingografia e recanalização da tuba uterina em mulheres que apresentavam possível obstrução de tuba uterina e obtiveram resultado satisfatório com reestabelecimento reprodutivo em muitas pacientes (Lang et al. 2000; Novy et al. 1988; Thurmond et al. 1990). Relataram, ainda, a possibilidade de perfuração da tuba uterina, resposta vasovagal e infecções pélvicas como complicações do procedimento. Mulheres podem apresentar gestação tubária após recanalização das trompas; situação que não ocorre em éguas devido às divergências na anatomia e fisiologia do órgão e do transporte embrionário entre as espécies (Bennett, 2006). Allahbadia et al. (2010) descreveram técnicas utilizadas na recanalização da tuba uterina de mulheres, realizadas com cateteres, fios-guia flexíveis atraumáticos ou sistema de balão por via endoscópica (Falloposcopia/Histeroscopia/Laparoscopia), sonográfica, fluoroscópica ou orientação tátil (Kerin et al. 1992). Al-Omari et al. (2018) descreveram resultados obtidos na taxa de concepção após recanalização da tuba uterina de mulheres com obstrução proximal da tuba e concluíram que a idade da paciente influenciou nas taxas de concepção devido à problemas de fertilidade secundários.

Hidrocanulação ou “Hydrotubation” por via histeroscópica, é outra técnica que vem sendo utilizada em éguas que apresentam histórico de infertilidade e provável bloqueio da tuba uterina (Inoue et al. 2017; Scoggin, 2021). É uma técnica não invasiva, que consiste na inserção de um cateter na junção útero-tubária guiado por endoscópio com posterior infusão de poucos mililitros de solução salina ou Ringer com Lactato. Inoue et al. (2017) obtiveram bons resultados no reestabelecimento da fertilidade de muitas éguas tratadas. Bennett (2006) descreveu a dificuldade em realizar cateterização da tuba uterina por histeroscopia ou laparoscopia pela pressão causada no lúmen do órgão, causando ejeção do cateter. Já Scoggin (2021) mencionou a necessidade de infusão lenta, rotação suave e ligeira retirada e introdução do cateter para facilitar a passagem do fluido pelo lúmen da tuba uterina sem que haja ejeção do cateter.

Outra técnica que vem sendo utilizada recentemente, é a aplicação de misoprostol na ponta do corno uterino, próximo à papila utero-tubária, utilizando uma pipeta longa flexível de inseminação. Técnica segura, não invasiva e barata (Alvarenga et al. 2018) que permitiu o reestabelecimento reprodutivo de muitas éguas que apresentavam infertilidade de causa desconhecida.

2.4. Misoprostol

2.4.1. Farmacologia

Sendo um análogo sintético de prostaglandina E1, o misoprostol, apresenta algumas diferenças estruturais da prostaglandina E permitindo aumento na potência anti-secretora, duração da ação da droga e melhora na segurança do medicamento. Vias de administração incluem oral, sublingual, vaginal e retal.

Tang et al. 2007 mostraram que as concentrações séricas de misoprostol tiveram um efeito mais prolongado quando administrado na vagina em mulheres (nível máximo alcançado em 80 minutos após a aplicação e redução gradual lenta com droga detectável permanecendo no corpo após 6 horas), enquanto que por via oral, mostrou uma concentração sérica máxima em 30 minutos e declínio rápido após 120 minutos. Não foram observados efeitos colaterais a níveis hematológico, endócrino, imunológico, respiratório, oftalmológico ou cardiovascular, de acordo com a dose recomendada mostrando ser uma droga segura. Aronsson et al. (2004) relataram uma ação mais rápida do misoprostol na contratilidade uterina quando administrado por via sublingual e vaginal em mulheres, quando comparado à administração oral.

Foi documentado por Chiossi et al. (2012) que em um estudo de meta-análise, mulheres que receberam PGE1 (misoprostol) apresentaram maior probabilidade de parto vaginal com menor necessidade de ocitocina do que outras que receberam PGE2.

O comprimido de misoprostol apresenta ingredientes inativos em sua composição:

- O óleo de rícino é uma fonte importante de gorduras especiais e seu principal ácido graxo é o ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi octadecenoico). Apesar de poucas informações sobre sua esterificação, a sua estrutura pode promover diversas reações como interesterificação, pirólise, desidratação, etoxilação, acilação, etoxilação e sulfação. Apresenta vantagem pois mesmo em baixa temperatura, não cristaliza devido ao seu alto peso molecular e grupo éster (Achaya, 1971; Penoyer, 1954).

- A hipromelose é comumente utilizada para formar matrizes solúveis intumescentes e proporcionar a liberação do fármaco de forma controlada. A hipromelose ou o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é éter de celulose hidrofílico não iônico solúvel em água que gelifica. Também é resistente às ações enzimáticas e se mantém estável às variações de pH entre 3,0 a 11,0 (Dow Commercial Information, 2002; Li et al. 2005).

- A substância natural celulose microcristalina (MCC) é obtida a partir de celulose purificada e parcialmente despolimerizada. Na forma coloidal, o MCC é utilizado como estabilizador de suspensão, regulador de viscosidade, emulsificante e retentor de água. Além de ser resistente, rígido, de natureza fibrosa, atóxica, cristalina, biodegradável e insolúvel em água (Merci et al. 2015; Vijayalakshmi et al. 2016).

- O amidoglicolato de sódio é um desintegrante eficiente que não é prejudicado na presença de lubrificantes, além de possuir alta capacidade de intumescimento e boas características de compressão e fluxo (Gohel et al. 2007; Miller, 2003).

2.4.2. Aplicabilidade geral

O misoprostol tem sido utilizado no tratamento de úlceras gástricas e duodenais em humanos, cães e equinos (Bauer, 1985; Garris et al. 1989) por suas propriedades protetoras de mucosa e anti-secretora de ácido gástrico (Aronsson et al. 2004; Tang et al. 2007; Hinsdale et al. 1974) e também na prática ginecológica e obstétrica, pois promove a contração uterina e aumento de tônus, relaxamento cervical e indução do parto (Tang et al. 2007; Aronsson et al. 2004; Kelly et al. 2013; Hofmeyr et al. 2010). As aplicações clínicas também incluem indução de aborto no primeiro trimestre de gestação (Fjerstad et al. 2009), contenção de hemorragia no pós-parto em humanos e facilita a drenagem uterina em equinos (Brinsko et al. 2011). Nie et al. (2003) relatou a utilização de prostaglandina E1 no relaxamento cervical de éguas virgens após inseminação. Chiossi et al. (2012) relataram que a dilatação cervical induzida por PGE1 e PGE2 está associada com o aumento de mediadores inflamatórios e remodelação da matriz extracelular através da diminuição das ligações de colágeno e glicosaminoglicanos. McNaughten et al. (2014) relataram que o relaxamento cervical depende de um sinergismo entre os mediadores inflamatórios interleucina-8 (IL-8), prostaglandina E (PGE), sintaxe de óxido nítrico e metaloproteinases de matrix extracelular.

2.4.3. Efeitos na reprodução equina

A administração oral de misoprostol (0.005mg/kg), em éguas, na dose recomendada para tratamento de ulcera gástrica não acelerou o transporte embrionário do oviduto para o útero e não alterou as concentrações de progesterona por não afetar o corpo lúteo de acordo com Checure et al. (2020).

McNaughten et al. (2014) descreveram a importância do relaxamento cervical no sucesso da reprodução equina por permitir melhor deposição do sêmen dentro do útero e facilitar a limpeza uterina contra contaminantes no período reprodutivo, evitando o desenvolvimento de endometrite pós cobertura com inflamação, acúmulo de fluido e efeitos adversos sobre a fertilidade; no entanto, o mesmo trabalho não evidenciou relaxamento cervical após administração tópica de PGE1.

Recentemente, começou-se a utilizar o misoprostol como uma técnica barata e não invasiva na tentativa de desobstrução de tuba uterina de éguas com histórico de subfertilidade ou infertilidade de causa não diagnosticada (Alvarenga et al. 2018). Porém, alguns relatos sugeriram que o misoprostol causa uma resposta inflamatória uterina exacerbada após a infusão (endometrite); mas isso não foi estudado criticamente para determinar se essas éguas têm endometrite não diagnosticada ou se de fato o misoprostol resulta em uma resposta inflamatória uterina exacerbada.

2.5. Endometrite

A endometrite, também conhecida como resposta inflamatória uterina, é normalmente fisiológica e visa limpar o útero contra bactérias, plasma seminal, excesso de espermatozoides e debris (Canisso et al. 2016, LeBlanc et al. 2009). Após qualquer infusão intrauterina (sêmen, fármaco ou outra substância), haverá aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente ativação de neutrófilos polimorfonucleares como barreira de defesa fisiológica primária. Éguas classificadas clinicamente como suscetíveis à endometrite, devido à dificuldade de limpeza uterina e acúmulo de líquido, podem apresentar uma resposta inflamatória exacerbada após a infusão. Por outro lado, éguas jovens e resistentes à endometrite, podem apresentar uma resposta inflamatória leve a moderada.

As várias funções da resposta imune inata são: barreira física contra antígenos, remoção de células mortas ou degeneradas, ativação de citocinas e cascata de complemento, detecção e apresentação do antígeno para que o sistema imune adquirido seja ativado (Segabinazzi et al., 2020).

O sistema imune inato é transitório, não específico, limitado e responde de forma rápida. Após reconhecimento e sinalização dos espermatozoides pelas células epiteliais do endométrio a resposta imune inata é ativada e responde com quimiotaxia e ativação dos neutrófilos com 30 minutos após a deposição de sêmen no lúmen uterino (Canisso et al. 2016; Marth et al. 2018; Nash et al. 2015). A digestão leucocítica tem por objetivo

eliminar, por fagocitose, debris, bactérias e células espermáticas não viáveis, independente da patogenicidade dos antígenos (Janeway et al. 2002; Medzhitov et al. 1998).

Após a inseminação artificial, o pico da inflamação endometrial acontece entre 12h e 24h com infiltração neutrofílica (Card, 2005). Todavia, quando essa primeira linha de defesa está prejudicada, a resposta inflamatória se prolonga por até 96 horas e o tempo da resolução da inflamação do útero aumenta (Segabinazzi et al. 2020; Zent et al. 1998). A migração de polimorfonucleares (PMNs) também pode estar prejudicada nas éguas susceptíveis que apresentam processos fibróticos degenerativos no endométrio (Woodward et al. 2013).

O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias somados a neutrofilia persistente e ao acúmulo de fluido criam um microambiente uterino hostil com fatores embriotóxicos capazes de reduzir a sobrevivência embrionária e reduzir a fertilidade (Díaz-Bertrana et al., 2021; Knutti et al., 2010; Robertson et al., 2018; Segabinazzi et al., 2020).

A ativação do sistema complemento tem por objetivo proteger o trato reprodutivo da égua contra partículas invasoras (Troedsson, 1999), além de contribuir com quimiotaxia de células inflamatórias, clearance fagocítico e opsonização de células degeneradas e micróbios (Hakansson et al., 1993; Kumar, 2019). A formação do complexo de ataque à membrana (MAC) induz a formação de poros na membrana plasmática e lise da célula-alvo (Rus et al., 2005).

Receptores das células endometriais reconhecem antígenos que são apresentados por macrófagos, células Natural Killer e dendríticas e podem desencadear uma resposta inflamatória (Janeway et al., 2002; Souza-Fonseca-Guimarães et al., 2012; Takeda et al., 2004; Turner et al., 2012).

O início da cascata inflamatória ocorre através da ativação da codificação de genes para citocinas pró-inflamatórias, incluindo ciclooxigenase-2 (COX-2) e as quimiocinas que modulam a reação inflamatória aguda (Chandrasekhalan et al., 2004; Girling et al., 2007; Takeda et al., 2004).

Após a inseminação artificial as citocinas modulam a resposta inflamatória endometrial, no entanto as éguas susceptíveis apresentam maior expressão de IL-6 (citocina pró-inflamatória), IL1RA, IFN γ (interferon gama), TNF α , e menor expressão de mRNA da citocina anti-inflamatória IL-10. Resultando em queda da fertilidade devido a uma inflamação intensa e prolongada além da diminuição de resposta aos patógenos e às células inviáveis (Canisso et al., 2016; Fumuso et al., 2003).

Atreya et al. (2000) e Jones (2005) sugerem que a IL-6 pró-inflamatória pode modular outras citocinas inflamatórias e induzir o aumento da inflamação. Também participa na transição da inflamação persistente para a crônica e da imunidade inata para a adquirida. A IL-1 é mediada pela IL1RN e está presente em processos reprodutivos normais, porém quando superativada pode estar envolvida nas patologias com dano tecidual (Diao et al., 2005; Gerard et al., 2004; Martoriato et al., 2003; Van Der Hoek et al., 1998; Xing et al., 1998).

Normalmente, éguas que apresentam maior susceptibilidade à endometrite expressam mais citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , CXCL8 e TNF α) que éguas resistentes. As células endoteliais vasculares são ativadas pelo estímulo inflamatório através da síntese de prostaglandinas, IL-1, IL-6 e TNF α , promovendo a quimiotaxia e adesão dos neutrófilos nas paredes dos vasos, a partir da síntese de integrinas, resultando em aumento da permeabilidade vascular com extravasamento do exsudato para o interstício e edema endometrial (Contran et al., 1999; Doré et al., 1996; Fumoso et al., 2006; Fumoso et al., 2007; Palm et al., 2008, Tizard, 2009).

Nas éguas susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura (EPPC), a neutrofilia acontece em 2 a 12 horas após (Woodward et al., 2013). E uma armadilha extracelular de neutrófilos (NETs) é formada com o intuito de promover o clearance uterino, eliminação de microorganismos e liberação de mediadores inflamatórios (Canisso et al., 2016; Rebordão et al., 2014). Os NETs apresentam propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras e são induzidos por complexos antígenos-anticorpos, outros agentes inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, CXCL8 e lipólise (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Garcia-Romo et al., 2011; Logters et al., 2009). A super estimulação na formação ou um decréscimo na degradação dos NETs podem prejudicar a função secretora do endométrio e aumentar as chances de fibrose (Canisso et al., 2016).

Nas éguas resistentes as citocinas pró-inflamatórias ativam e elevam a resposta inflamatória em 2 a 6 horas após a inseminação, enquanto que as citocinas anti-inflamatórias modulam as citocinas pró-inflamatórias para que haja resolução da inflamação sem que ocorra danos no tecido (Cyktor et al., 2011; Hackett et al., 2008; Parhan, 2005; Woodward et al., 2013).

A falha no equilíbrio dos efeitos das citocinas pró-inflamatórias e das anti-inflamatórias nas éguas susceptíveis prejudica a frequência, a duração e a intensidade das contrações miométriais (Troedsson et al., 1993). A redução da eficiência em eliminar espermatozoides e fluidos ocorre pela inabilidade em contrair o útero de maneira eficaz e pode ser agravada pelo aumento do óxido nítrico, um potente relaxante muscular

(Canisso et al., 2016; Ferris, 2017). Com a redução do clearance de produtos inflamatórios há aumento e persistência dos PMNs no endométrio, resultando em uma inflamação intensa e prolongada (LeeBlanc et al., 1994; Troedsson et al., 1993).

2.5.1. Endometrite bacteriana aguda

O número de microorganismos aumenta no sistema reprodutivo caudal que compreende a vulva, o clitóris e a vagina, e diminui no sistema reprodutivo cranial que compreende cérvix e útero (Katila, 2016). Dessa forma, qualquer falha nos mecanismos de defesa física pode predispor o útero à infecção (Troedsson et al. 2016), seja por redução da resposta imune inata, inabilidade de contração uterina, posição do útero no abdômen (útero penduloso), anormalidades ou fibrose da cérvix, má conformação ou defeitos anatômicos vestibulo-vaginal e de períneo (Hemberg et al. 2005, Ferris, 2017). Em casos de endometrite bacteriana aguda, podem ser observados: descarga vaginal ou de cérvix e acúmulo de fluido intrauterino durante avaliação ultrassonográfica transretal.

A defesa imune celular e humoral deficiente e o desequilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias provenientes do sistema imune inato, também estão associados ao desenvolvimento de endometrite persistente (Woodward et al. 2013, Troedsson, 1999, Asbury et al. 1982).

2.5.2. Endometrite bacteriana crônica

Compreende uma endometrite infecciosa na qual os tratamentos não foram eficientes para eliminar a bactéria, devido a reinfecções e resistência desenvolvida pelos patógenos aos antimicrobianos (Ferris, 2017). As bactérias mais comuns envolvidas nas infecções uterinas são: *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Actinomyces* e *Lactobacillus* spp (Frontoso et al. 2008, Davis et al. 2013).

2.5.3. Métodos Diagnósticos: Citologia e Cultura Uterinas

Comumente, a citologia uterina é realizada para diagnosticar a inflamação endometrial pela presença de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs). E a técnica de cultura permite a identificação e caracterização do micro-organismo envolvido (Ferris,

2016). E a associação dessas técnicas apresentam vantagem em diagnosticar endometrite (Ferris et al. 2015).

Lavagem uterina de baixo volume, cytobrush e swabs uterinos são técnicas utilizadas no diagnóstico de endometrite e normalmente dão um número elevado de células preservadas (Canisso et al. 2016). Todavia, o lavado com baixo volume se torna uma amostra mais representativa por apresentar maior contato com a superfície endometrial (LeBlanc et al. 2007).

A histopatologia endometrial a partir de uma biópsia uterina permite avaliar a leitura da citologia endometrial e cultura microbiológica, principalmente quando o diagnóstico através das outras técnicas foi inconclusivo (Nielsen, 2005, Nielsen et al. 2010, Nielsen et al. 2012, LeBlanc et al. 2009).

O resultado de uma citologia negativa com uma cultura positiva pode ser observado em algumas infecções bacterianas, principalmente crônicas, onde a presença do patógeno não está associada à resposta inflamatória. A citologia positiva associada à cultura positiva revela infecção uterina (Riddle et al. 2007). As éguas que apresentam citologia positiva junto a cultura negativa sugerem endometrite induzida não infecciosa, podendo ser causadas por urovagina, pneumovagina e endometrite pós cobertura (Ball et al. 1988, Rodier et al. 2012).

A presença de biofilme produzido por alguns micro-organismos também pode caracterizar cultura negativa com citologia positiva (Ball et al. 1988) e estão associados à endometrite crônica, após repetidas terapias antimicrobianas sem sucesso (Causey, 2006, LeBlanc, 2010).

2.5.4. Tratamentos

A N-Acetilcisteína é uma substância mucolítica muito utilizada para redução da viscosidade do muco no útero (Zuin et al. 2005), sugerindo ainda redução das bactérias que formam o biofilme e diminuição da própria biomassa do biofilme (Ferris et al. 2016), melhorando a taxa de prenhez (Canisso et al. 2016) e provando ser um tratamento seguro (Gores-Lindholm et al. 2013).

O tris-EDTA pode potencializar os efeitos dos antimicrobianos, reduzindo a resistência bacteriana através da sua função de quelar magnésio e cálcio da parede celular das bactérias (Lyle et al. 2011). Já o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) também tem sido utilizado com eficiência bactericida e contra biofilmes (Ferris et al. 2016). Dimetilsulfoxido (DMSO) é utilizado na tentativa de reduzir a inflamação uterina por limpar

radicais livres, porém, concentrações altas podem causar irritação do endométrio (Canisso et al. 2016).

As drogas imunomoduladoras são utilizadas principalmente para reduzir a reação inflamatória em éguas susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura e maximizar as taxas de parto (Canisso et al. 2016). Deste modo, a administração de corticosteroides prednisona e, principalmente, de dexametasona tem mostrado eficiência na melhoria das taxas de prenhes (Dell'Aqua et al. 2006). LeBlanc (1997), Reilas et al. (2006), Armstrong (1981) e Cuervo-Arango (2011) observaram aumento da reação inflamatória e redução na limpeza uterina em doses recomendadas; e aumento dos índices de folículos anovulatórios hemorrágicos quando na utilização de altas doses de anti-inflamatórios não estereoidais (AINEs) não-seletivos COX-2. Já a utilização de AINEs seletivos COX-2 (firocoxib e vedaprofeno) resultaram em aumento nas taxas de prenhez, com redução da resposta inflamatória uterina após inseminação, sem que houvesse alterações no processo ovulatório (Rojer et al. 2010, Friso et al. 2019).

As células tronco mesenquimais são uma alternativa para o tratamento de fibrose endometrial (Alvarenga et al. 2016) por terem a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células incluindo as endometriais (Du et al. 2007), além de sinalizar, a partir de outras células, propriedades imunomoduladoras, quimiotáticas e anti-apoptóticas (Mambelli et al. 2014). Em modelos experimentais, foram capazes de reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL1 β e IL17) e aumentar as citocinas anti-inflamatórias (IL2, IL4, IL10 e fator de crescimento fibroblástico básico) (Bai et al. 2009, Mao et al. 2009, Zhao et al. 2015).

O lavado uterino com solução de ringer com lactato é comumente utilizado pré inseminação e a partir de 6 horas após inseminação, com o objetivo de remover acúmulo de fluido, micro-organismos, células espermáticas e, principalmente, produtos inflamatórios no momento crítico da inflamação uterina (Troedsson et al. 2016, Woodward et al. 2013).

O uso de drogas ecbólicas é frequentemente associado ao tratamento com lavado uterino, para auxiliar na recuperação do fluido (Troedsson et al. 1995, Mattos et al. 1999). Os agentes ecbólicos são drogas que estimulam a contração uterina, principalmente em éguas susceptíveis com contratilidade miometrial comprometida, promovendo eliminação do fluido uterino (Canisso et al. 2016, LeBlanc et al. 1997, Troedsson et al. 2005). A ocitocina na dose de 10-20UI está associada às contrações fortes por um período de até 45 minutos (Madill et al. 2002). A carbetocina é um análogo da ocitocina com ação mais longa (Schramme et al. 2008). Já o cloprostenol (análogo de

prostaglandina F2alpha) induz contrações uterinas mais brandas e prolongadas, por um período acima de 2 horas (Troedsson et al. 1995), porém, pode estar associado a formação de folículos hemorrágicos em éguas que apresentam predisposição e não é recomendado no período pós ovulação, por interferir negativamente sobre a formação do corpo lúteo (Troedsson et al. 2001, Cuervo-Arango et al. 2010).

Plasma é administrado de forma intrauterina como alternativa de tratamento aos antibióticos, pois está associado a eliminação de patógenos no útero (Neves et al. 2007, Zerbe et al. 2003). O plasma rico em plaquetas (PRP) é capaz de modular a resposta inflamatória uterina após inseminação, reduzindo a síntese de óxido nítrico e de citocinas próinflamatórias, resultando na melhora da taxa de prenhez (Segabinazzi et al. 2017, Reghini et al. 2016, Metcalf et al. 2012, Metcalf, 2014).

3. CONCLUSÃO

A obstrução da tuba uterina pode dificultar o transporte espermático ao local de fertilização e a descida do embrião para o útero levando a falhas na fertilização, recuperação embrionária e/ou concepção. A aplicação de misoprostol, prostaglandina E1, próximo à papila útero-tubária é uma técnica recente que tem permitido o reestabelecimento reprodutivo de muitas éguas que apresentam infertilidade, no entanto, após infusão de misoprostol, assim como ocorre após inseminação ou após infusão intrauterina de outros fármacos, ocorre uma resposta inflamatória uterina chamada de endometrite, que por sua vez, é normalmente fisiológica e visa limpar o útero contra bactérias, plasma seminal, excesso de espermatozoides e outros debris. No entanto, existe uma diferença entre éguas resistentes e susceptíveis à endometrite, que apresentam graus diferentes de reação inflamatória podendo variar de leve a exacerbada.

Relatos na pratica clinica sugerem que o misoprostol causa uma resposta inflamatória uterina exacerbada após a infusão; mas isso não foi estudado criticamente para determinar se essas éguas têm endometrite não diagnosticada ou se de fato o misoprostol resulta em uma resposta inflamatória uterina exacerbada. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a resposta inflamatória e potenciais reações sistêmicas após a administração uterina de misoprostol, seja pré inseminação, durante o estro, ou imediatamente após a colheita de embrião.

4. REFERÊNCIAS

- Abe H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol.* 1996;11(3):743-68.
- Achaya KT. Chemical derivatives of castor oil. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 1971 Nov;48(11):758–63.
- Agrawal NM, Saffouri B, Kruss DM, Callison DA, Dajani EZ. Healing of benign gastric ulcer. *Digestive Diseases and Sciences.* 1985;30(S11):164S—70S.
- Allahbadia GN, Merchant R. Fallopian Tube Recanalization: Lessons Learnt and Future Challenges. *Women's Health.* 2010;6(4):531-49.
- Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN. Laparoscopic application of PGE2 to re-establish oviducal patency and fertility in infertile mares: a preliminary study. *Equine Veterinary Journal.* 2010;38(5):454-9.
- Allen W, Kessy B, Noakes D. Evaluation of uterine tube function in pony mares. *Veterinary Record.* 1979;105(16):364-6.
- Al-Omari M, Obeidat N, Elheis M, Khasawneh R, Gharaibeh M. Factors Affecting Pregnancy Rate Following Fallopian Tube Recanalization in Women with Proximal Fallopian Tube Obstruction. *Journal of Clinical Medicine.* 2018;7(5):110.
- Alvarenga MA, do Carmo MT, Segabinazzi LG, Guastali MD, Maia L, Landim-Alvarenga FC. Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science.* 2016;42:12-8.
- Alvarenga MA, Segabinazzi LG. Application of Misoprostol as a Treatment of Unexplained Infertility in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science.* 2018;71:46-50.
- Armstrong DT. Prostaglandins and follicular functions. *Journal of reproduction and fertility.* 1981 May; V. 62, n. 1, p. 283–91.
- Arnold CE, Love CC. Laparoscopic evaluation of oviductal patency in the standing mare. *Theriogenology.* 2013;79(6):905-10.
- Aronsson A. Effects of misoprostol on uterine contractility following different routes of administration. *Human Reproduction.* 2004;19(1):81-4.
- Asbury, A.C.; Schultz, P.H.; Klesius, G.N.; Foster, G.N.; Washburn, S.M. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. *J. Reprod. Fert. (Suppl).* 1982;32:151-9.
- Avilés M, Coy P, Rizos D. The oviduct: A key organ for the success of early reproductive events. *Animal Frontiers.* 2015;5(1):25-31.
- Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, Miller RH. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia.* 2009 Aug 15;57(11):1192-203.
- Ball BA. Embryonic death in mares. In: McKinnon AO, Voss JL. *Equine Reproduction.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. 517-31.

- Ball BA, Shin SJ, Patten VH, Lein DH, Woods GL. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology*; 1988 Jun;29(6):1269-83.
- Bauer RF. Misoprostol preclinical pharmacology. *Digestive Diseases and Sciences* [Internet]. Nov 1985 [citado 22 Apr 2022];30(S11):118S—25S. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf01309396>
- Bennett SD. Diagnosis of disorders involving the oviduct, along. *Current Therapy in Equine Reproduction*. 2006;78.
- Betteridge KJ, & Mitchell D. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *Reproduction*. 1974;39(1):145-8.
- Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. *Manual of Equine Reproduction*. 3rd ed. Maryland Heights: Elsevier; 2011.
- Canisso IF, Stewart J, Silva MAC. Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2016 Dec;32(3): 465-80
- Causey RC. Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. *The Veterinary Journal*. 2006 Nov;172(3):405-21.
- Checura CM, Momont HW, Castañeira C, Flores-Bragulat A, Losinno L. Oral misoprostol does not hasten oviductal transport of day-5 horse embryos. *Animal Reproduction Science*. 2020 Dec; 223: 106626.
- Chiossi G, Costantine M, Bytautiene E, Kechichian T, Hankins G, Sbrana E, Saade G, Longo M. The Effects of Prostaglandin E1 and Prostaglandin E2 on in vitro Myometrial Contractility and Uterine Structure. *American Journal of Perinatology*. 25 may 2012; 29(08): 615-22.
- Croxatto HB. Physiology of gamete and embryo transport through the Fallopian tube. *Reproductive BioMedicine Online*. 2002 Jan;4(2):160–9.
- Cuervo-Arango J, Newcombe J. Risk Factors for the Development of Haemorrhagic Anovulatory Follicles in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008 Oct 16;45(3):473-80.
- Cuervo-Arango J. The effect of treatment with flunixin meglumine at different times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in mares. *Animal Reproduction Science*. 2011Aug;127(1-2):84-90.
- Davis HA, Stanton MB, Thungrat K, Boothe DM. Uterine bacterial isolates from mares and their resistance to antimicrobials: 8,296 cases (2003–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2013 Apr;242(7):977-83.
- Dell'Aqua JAJr, Papa FO, Lopes MD, Alvarenga MA, Macedo LP, Melo CM. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Animal Reproduction Science*. 2006 Aug;94(1-4):270-3.
- Desantis S, Acone F, Corriero A. Distribution of sialoglycoconjugates in the oviductal isthmus of the horse during anoestrus, oestrus and pregnancy: a lectin histochemistry study. *European Journal of Histochemistry*. 2009 Jun 29;48(4):403.
- Du H, Taylor HS. Contribution of Bone Marrow-Derived Stem Cells to Endometrium and Endometriosis. *Stem Cells*. 2007 Apr 26;25(8):2082-86.
- Ellinger JV, Kirton KT. Ovum Transport in Rabbits Injected with Prostaglandin E1 and F2 α . *Biology of Reproduction*. 1974 Aug 1; 11(1): 93-6.

Ferris RA, Bohn A, McCue PM. Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. *Equine Veterinary Education*. 2015 Feb 3;27(6):316–22.

Ferris RA. Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. *Vet. Clin. Equine*. 2016;32:481-98.

Ferris RA. Therapeutics for Infectious Endometritis: A Clinical Perspective. *Rev. Bras. Reprod. Animal*. 2017;41(1):175-9.

Ferris RA, McCue PM, Borlee GI, Loncar KD, Hennet ML, Borlee BR. In Vitro Efficacy of Nonantibiotic Treatments on Biofilm Disruption of Gram-Negative Pathogens and an In Vivo Model of Infectious Endometritis Utilizing Isolates from the Equine Uterus. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 30 dez 2015 [citado 22 abr 2022];54(3):631-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.02861-15>

Fialho SD, Figueiró GM, Lehnhühl RC, Pasin M, Rubin MI, Silva CA. Abordagem laparoscópica na égua como meio auxiliar nas técnicas de reprodução assistida. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2001; 38(5): 229-32.

Fjerstad M, Sivin I, Lichtenberg ES, Trussell J, Cleland K, Cullins V. Effectiveness of medical abortion with mifepristone and buccal misoprostol through 59 gestational days. *Contraception* [Internet]. Set 2009 [citado 22 abr 2022];80(3):282-6. Disponível em:

Freeman DA, Woods GL, Vanderwall DK, Weber JA. Embryo-initiated oviductal transport in mares. *Reproduction* [Internet]. 1 jul 1992 [citado 22 abr 2022];95(2):535-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950535>

Friso AM, Segabinazzi LGTM., Cyrino M, Correal SB, Freitas-Dell'Aqua CP, Teoro do Carmo M, Alvarenga MA. Periovarian administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. *Theriogenology* [Internet]. 2019 Oct 15 [cited 2021 May 6];138:24–30.

Frontoso R, De Carlo E, Pasolini MP, van der Meulen K, Pagnini U, Iovane G, et al. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Research in Veterinary Science*. 2008 Feb;84(1):1–6.

Garris RE, Kirkwood CF. Misoprostol: A prostaglandin E1 analogue. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 1989 Oct 1;46(10):2162–70.

Gohel MC, Parikh RK, Brahmabhatt BK, Shah AR. Preparation and assessment of novel coprocessed superdisintegrant consisting of crospovidone and sodium starch glycolate: A technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2007 Mar;8(1):E63–9.

Gores-Lindholm AR, LeBlanc MM, Causey R, Hitchborn A, Fayerer-Hosken RA, Kruger M, et al. Relationships between intrauterine infusion of N-acetylcysteine, equine endometrial pathology, neutrophil function, post-breeding therapy, and reproductive performance. *Theriogenology*. 2013 Aug;80(3):218–27.

Hemberg E, Lundeheim N, Einarsson S. Retrospective Study on Vulvar Conformation in Relation to Endometrial Cytology and Fertility in Thoroughbred Mares. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. Nov 2005; 52(9): 474-7.

Hinsdale JG, Engel JJ, Wilson DE. Prostaglandin E in peptic ulcer disease. *Prostaglandins*. 1974 Jun;6(6):495–500.

Hofmeyr GJ, Gülmezoglu AM, Pileggi C. Vaginal misoprostol for cervical ripening and induction of labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010 Oct 6; 10:CD000941.

<https://doi.org/10.1016/j.contraception.2009.03.010>

- Hunter R. Vital Aspects of Fallopian Tube Physiology in Pigs. *Reproduction in Domestic Animals*. 2002 Aug;37(4):186–90.
- Hunter RHF. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reproduction Nutrition Development*. 2005 May;45(3):281–90.
- Inoue Y, Sekiguchi M. Clinical application of hysteroscopic hydrotubation for unexplained infertility in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 2017 Dec 5;50(4):470–3.
- Inoue Y. Hysteroscopic hydrotubation of the equine oviduct. *Equine Veterinary Journal*. 2013 Jun 28;45(6):761–5.
- Jansen RPS. Endocrine Response in the Fallopian Tube. *Endocrine Reviews* [Internet]. 1984 Oct 1 [citado 2021 May 21];5(4):525–51. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article-abstract/5/4/525/2548798?redirectedFrom=fulltext>
- Katila T. Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reproductive Biology*. 2016 Sep;16(3):189–96.
- Kelly AJ, Alfircvic Z, Ghosh A. Outpatient versus inpatient induction of labour for improving birth outcomes. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013 Nov 12.
- Kerin JF, Williams DB, San Roman GA, Pearlstone AC, Grundfest WS, Surrey ES. Falloposcopic classification and treatment of fallopian tube lumen disease. *Fertility and Sterility*. 1992 Apr;57(4):731–41.
- Köllmann M, Rötting A, Heberling A, Sieme H. Laparoscopic techniques for investigating the equine oviduct. *Equine Veterinary Journal*. 2010 Aug 23;43(1):106–11.
- Lang EK, Dunaway HE. Efficacy of Salpingography and Transcervical Recanalization in Diagnosis, Categorization, and Treatment of Fallopian Tube Obstruction. *CardioVascular and Interventional Radiology*. 2000 Oct 15;23(6):417–22.
- Lantz KC, Enders AC, Liu IKM. Possible significance of cells within intraluminal collagen masses in equine oviducts. *The Anatomical Record*. 1998 Dec;252(4):568–79.
- LeBlanc M, Causey R. Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009 Sep;44:10–22.
- LeBlanc M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010 May 17;45:21–7.
- LeBlanc MM, Magsig J, Stromberg AJ. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*. 2007 Aug;68(3):403–12.
- LeBlanc MM. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*. 1997;13(5):483–5.
- Li CL, Martini LG, Ford JL, Roberts M. The use of hypromellose in oral drug delivery. *The Journal of pharmacy and pharmacology* [Internet]. 2005 [cited 2019 Oct 29];57(5):533–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15901342>
- Lyle SK, LeBlanc MM, Staepfli SA, Beehan DP, Morgan T. How to use buffered chelator solution for mares with chronic endometritis. *Proceedings Am. Assoc. Equine Pract.* 2011;57:16-8.
- Madill S, Troedsson MHT, Santschi EM, Malone ED. Dose–response effect of intramuscular oxytocin treatment on myometrial contraction of reproductively normal mares during estrus. *Theriogenology*. 2002 Aug;58(2-4):479–81.

- Mambelli LI, Mattos RC, Winter GHZ, Madeiro DS, Morais BP, Malschitzky E, et al. Changes in Expression Pattern of Selected Endometrial Proteins following Mesenchymal Stem Cells Infusion in Mares with Endometrosis. *Nataf S, editor. PLoS ONE*. 2014 Jun 5;9(6):e97889.
- Mao F, Xu W-R, Qian H, Zhu W, Yan Y-M, Shao Q-X, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells in collagen-induced mouse arthritis. *Inflammation Research*. 2009 Sep 10;59(3):219–25.
- Mattos RC, Castillo LFF, Malschitzky E, Mattos R, Gregory RM. Treatment of endometritis of experimentally infected mares. I. Effect of lavage, plasma and leukocytes on uterine bacterial challenge. *Arq Fac Vet*. 1999;27:49-60.
- McNaughten J, Pozor M, Macpherson M, Kelleman A, Woodward E, Troedsson M. Effects of Topical Application of Misoprostol on Cervical Relaxation in Mares. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014 Nov 1;49(6):1057–62.
- Medenbach K, Aupperle H, Schoon D, Wittenbrink MM, Schoon HA. Pathology of the equine salpinx. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*. 1999;15(6):560–7.
- Merci A, Urbano A, Grossmann MVE, Tischer CA, Mali S. Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion. *Food Research International*. 2015 Jul;73:38–43.
- Metcalf ES, Scoggin K, Troedsson MHT. The effect of platelet-rich plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following semen deposition. *Journal of Equine Veterinary Science [Internet]*. 2012 Aug [cited 2021 Jul 18];32(8):498.
- Metcalf ES. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). *Journal of Equine Veterinary Science*. 2014 Jan;34(1):128.
- Miller RW. Sodium starch glycolate. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ, editors. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 4th ed. Washington, DC: American Pharmaceutical Association; 2003;581–4. Troedsson MHT, Liu IKM, Ing M, Pascoe J. Smooth Muscle Electrical Activity in the Oviduct, and the Effect of Oxytocin, Prostaglandin F₂ α , and Prostaglandin E₂ on the Myometrium and the Oviduct of the Cycling Mare1. *Biology of Reproduction*. 1995 Jan 1;52(monograph_series1):475–88.
- Neves AP, Keller A, Trein CR, Möller G, Jobim MIM, Castilho LFF, et al. Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus*. *Animal Reproduction Science*. 2007 Feb;97(3-4):314–22.
- Nie GJ, Barnes AJ. Use of prostaglandin E1 to induce cervical relaxation in a maiden mare with post breeding endometritis. *Equine Veterinary Education*. 2010 Jan 5;15(4):172–4.
- Nielsen JM, Nielsen FH, Petersen MR. Diagnosis of equine endometritis- microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility, *Pferdeheilkunde*. 2012;28:8-13.
- Nielsen JM, Troedsson MH, Pedersen MR, Bojesen AM, Lehn-Jensen H, Zent WW. Diagnosis of Endometritis in the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the Endometrium: Comparison of Results Obtained by Swabs and Biopsies. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2010 Jan;30(1):27–30.
- Nielsen JM. Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*. 2005 Aug;64(3):510–8.

- Novy MJ, Thurmond AS, Patton P, Uchida BT, Rosch J. Diagnosis of cornual obstruction by transcervical fallopian tube cannulation**Supported in part by the George Alfred Cook Memorial Fund through the Medical Research Foundation of Oregon.††Presented in part at the 43rd Annual Meeting of the American Fertility Society, Reno, Nevada, September 28 to 30, 1987. *Fertility and Sterility*. 1988 Sep;50(3):434–40.
- Oguri N, Tsutsumi Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *Reproduction*. 1972 Nov;31(2):187–95.
- Ortis HA, Foss RR, McCue PM, Bradecamp EA, Ferris RA, Hendrickson DA. Laparoscopic Application of PGE₂ to the Uterine Tube Surface Enhances Fertility in Selected Subfertile Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013 Nov;33(11):896–900.
- Parker NA, Bailey TL, DiGrassie WA. Modified Technique to Evaluate Uterine Tubal Patency in the Mare. 1998;Red:24-48.
- Pauerstein CJ, Woodruff JD, Zachary AS. Factors influencing physiologic activities in the fallopian tube; the anatomy, physiology, and pharmacology of tubal transport. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 1968 Mar;23(3):215–43.
- Penoyer CE, von Fischer W, Bobalek EG. Synthesis of drying oils by thermal splitting of secondary fatty acid esters of castor oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1954 Sep;31(9):366–70.
- Pye J, Clulow J, Adkins A. Laparoscopic transection of restrictive bands of the mesosalpinx as adjunct to the use of prostaglandin E₂ for mares with suspected uterine tubal blockage. *Australian Veterinary Journal*. 2018 Jun 25;96(7):252–6.
- Reghini MFS, Ramires Neto C, Segabinazzi LG, Castro Chaves MMB, Dell'Aqua C de PF, Bussiere MCC, et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology*. 2016 Jul;86(2):516–22.
- Reilas T, Risco AM, Kareskoski M, Katila, T. Effect of flunixin meglumine and oxytocin on uterine response to insemination in mares. *Animal Reproduction Science*. 2006 Aug;94(1-4):252–3.
- Riddle WT, LeBlanc MM, Stromberg AJ. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*. 2007 Aug;68(3):395–402.
- Rodier D, Ponthier J, Perrilla-Hernández S, Deleuze S. Effect of artificial insemination site on post-mating endometritis in the mares. *Reprod. Domest. Anim*. 2012; 47(S5):103.
- Rojer H, Aurich C. Treatment of Persistent Mating-Induced Endometritis in Mares with the Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug Vedaprofen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010 Jan 14;45(6):2009-10.
- Roth-Brandel U, Bygdeman M, Wiqvist N. Effect of Intravenous Administration of Prostaglandin E₁ and F₂ α on the Contractility of the Non-Pregnant Human Uterus in Vivo. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 1970 Jan;49(s5):19–25.
- Schramme AR, Pinto CRF, Davies J, Whisnant CS Whiacre MD. Pharmacokinetics of carbetocin, a long-acting oxytocin analogue, following intravenous administration in horses. *Equine Veterinary Journal*. 2008 Nov;40(7):658–61.
- Scoggin CF. Hysteroscopic Hydrotubation of the Oviducts. *Equine Reproductive Procedures*. 2021 Feb 19;121–122. doi:10.1002/9781119556015.

- Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho AM, Dell'Aqua JA, Miró J, et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology*. 2017 Dec;104:120–6.
- Shettko DL, Hendrickson DA. Complications of Equine Laparoscopy. *Complications in Equine Surgery*. 2021;391–403.
- Tang OS, Gemzell-Danielsson K, Ho PC. Misoprostol: Pharmacokinetic profiles, effects on the uterus and side-effects. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2007 Oct 26;99:S160–7.
- Thurmond AS, Machan LS, Maubon AJ, Rouanet J-P, Hovsepian DM, Van Moore A, et al. A Review of Selective Salpingography and Fallopian Tube Catheterization. *RadioGraphics*. 2000 Nov;20(6):1759–68.
- Thurmond AS, Rösch J. Nonsurgical fallopian tube recanalization for treatment of infertility. *Radiology*. 1990 Feb;174(2):371–4.
- Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*. 2001 Dec;68(3-4):273–8.
- Troedsson MHT, Scott M, Liu IKM. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. *Am. J. Vet. Res.* 1995;56:468-72.
- Troedsson MHT, Woodward EM. Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. *Reproductive Biology*. 2016 Mar;16(1):8–12.
- Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 1999 Aug;52(3):461–71.
- Tsutsumi Y, Suzuki H, Takeda T, Terami Y. Evidence of the origin of the gelatinous masses in the oviducts of mares. *Reproduction*. 1979 Nov 1;57(2):287–90.
- Vijayalakshmi K, Gomathi T, Latha S, Hajeeth T, Sudha PN. Removal of copper(II) from aqueous solution using nanochitosan/sodium alginate/microcrystalline cellulose beads. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016 Jan;82:440–52.
- Weber JA, Woods GL. Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. *Equine Veterinary Journal*. 2010 Jun 10;25(S15):36–8.
- Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D, Scoggin KE, et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *REPRODUCTION*. 2013 Mar;145(3):289–96.
- Zent WW, Liu IKM, Spirito MA. Oviduct flushing as a treatment for infertility in the mare. *Equine Veterinary Journal*. 2010 Jun 10;25(S15):47–8.
- Zerbe H, Castilho LFF, Engelke F, Mattos RC, Schuberth H-J., Klug E, et al. Isolation and Cryopreservation of Functionally Competent Equine Leucocytes. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 2003 May;50(4):179–84.
- Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium. *Reproductive Sciences*. 2015 Feb 13;22(2):181–8

Zuin R, Palamidese A, Negrin R, Catozzo L, Scarda A, Balbinot M. High-Dose N-Acetylcysteine in Patients with Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinical Drug Investigation*. 2005;25(6):401–8.

HIPÓTESE

O misoprostol promove uma reação inflamatória uterina diferente de acordo com a fase do ciclo estral (estro e diestro).

OBJETIVOS

- 1) Determinar a resposta inflamatória com base na citologia endometrial, acúmulo de fluido intrauterino e edema uterino nos momentos 24h, 48h e 72h da infusão de misoprostol e de Ringer com Lactato.
- 2) Determinar a diferença na resposta inflamatória entre estro e diestro baseando-se na citologia, acúmulo de fluido intrauterino e edema uterino.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Uterine inflammatory response after prostaglandin E1 (misoprostol) infusion pre breeding or immediately after embryo flushing in commercial donor mares

Artigo redigido nas normas da Journal of Equine Veterinary Science (JEVS), ISSN 0737-0806, 2020: 1.583 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021, ranqueada como B2 pelo QUALIS - CAPES.

Amorim GBAG^{a,1}, Segabinazzi LGTM^{b,1}, Oliveira OM^{a,1}, Perecmanis S^c, Oliveira RA^c,
Canisso IF^{a,d,*}

^a São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo, Brazil

^b Ross University School of Veterinary Medicine, Basseterre, St. Kitts, West Indies

^c University of Brasília (UnB), School of Agronomy and Veterinary Medicine, Brasília, Brazil

^d Department of Veterinary Clinical Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Illinois Urbana Champaign, Urbana IL 61802, USA.

¹ Contributed equally to this work as the first author

Highlights

- Misoprostol infusion resulted in similar inflammatory response to sham infusion
- Pre-breeding or immediately post-embryo flushing infusion of misoprostol and sham infusion
- transiently increase uterine neutrophils
- Uterine edema and fluid were similar between sham and misoprostol infusions.
- Embryo recovery were similar across groups

Abstract

This study aimed to assess the inflammatory response and potential systemic reactions after uterine administration of misoprostol, either during pre-breeding or immediately after post-embryo flushing. Privately owned embryo donor mares (n=11) were randomly assigned in a crossover design to receive misoprostol (3 mL +200 µg) or sham (3 mL of lactate Ringer's solution) infusions, bilaterally deposited via deephorn, at least 72h pre-breeding (experiment 1) or immediately after embryo flushing (experiment 2). Each mare had one cycle for misoprostol and sham in both experiments and a breeding cycle (no sham or misoprostol) between experiments. Uterine edema, fluid accumulation, and the number of uterine PMN were assessed before each infusion and then daily for 72h. Uterine lavage was performed the day after each infusion across groups and experiments. Ovulation was hastened with a GnRH agonist and confirmed at 24h-intervals. Mares were bred with semen from six stallions. Embryo flushing was performed 8- to 9-d post-ovulation. In either experiment, misoprostol did not affect uterine edema or fluid accumulation ($P>0.05$). However, both the sham and misoprostol infusions increased the number of PMN up to 48h postinfusion in both experiments. Embryo recoveries were similar between sham (45%, 5/11) and misoprostol cycles in experiments 1 (45%, 5/11; $P>0.05$) and 2 (sham, 68%, 7/11; misoprostol, 45%, 5/11; $P>0.05$). In conclusion, misoprostol did not induce exacerbated uterine inflammation in mares or systemic adverse reactions when infused pre-breeding or immediately after embryo flushing.

Keywords: Equine endometritis; infertility; prostaglandine E-1; uterine tube.

1. INTRODUCTION

Mare subfertility, also called “the problem mare,” represents the main clinical issue seen in referral equine theriogenology practices and breeding farms. Mares can be truly subfertile or might have been subjected to improper breeding management (e.g., poor timing) or were bred with subfertile/infertile stallions. While working with problem mares is paramount to determine the cause(s) of true/apparent subfertility to ensure that the mare can be adequately managed. Mare subfertility can be multifactorial, and it could be due to problems in the external or internal genitalia, gonads, systemic problems, or genetic abnormalities ^[1]. Of the realm of possible causes of subfertility in mares, it is believed that persistent breeding induced endometritis and poor vulvar conformation are the leading causes in mares ^[1,2]. Arguably, problems of the uterine tube have been suggested to be the third most common cause of subfertility in mares; however, the true incidence is lacking.

A gelatinous mass, presumably formed by uterine tube epithelial cells and degenerated oocytes, may be present in the ampulla-isthmus of mares ^[3]. In some mares, this gelatinous mass is thought to obstruct the uterine tubes for unknown reasons, thus hampering their fertility ^[4,5]. Over the years, multiple techniques have been developed to treat putative uterine tube obstruction in mares. The techniques vary from instillation of prostaglandin E2 (PGE2) over the uterine tubes’ surface via laparoscopic approach; retrograde flushing of the abdominal opening of the uterine tube via laparotomy, antegrade hydro cannulation of the uterine opening of the uterine tube via hysteroscopy, deep-horn infusion of PGE2 or and more recently prostaglandin E1 (PGE1) ^[5–12]. However, the need for specific skills, the high costs, invasiveness, and risks for the mare inherent with some of these techniques have prevented their wide use in equine clinical practice.

This scenario has been changing as more clinicians are treating mares suspected to have uterine tube obstruction after the publication of a case series out of Brazil suggesting that mares with the unapparent cause of subfertility could benefit from the application of misoprostol, a synthetic PGE1, via an AI pipette deposited deep into the uterine horns ^[12]. While this technique has been previously used in the United States and other parts of the world, the apparent enhancement of fertility reported by investigators out of Brazil, coupled with the

low costs and simplicity of the technique ^[12,13], has encouraged a massive worldwide use of misoprostol infusion for mares with suspicious uterine tube obstruction.

In the United States, uterine infusion of misoprostol is primarily performed pre breeding (i.e., when mares are coming in or are in estrus) and less commonly performed immediately after a negative embryo flushing 7-9 days post-ovulation (when mares are in diestrus). The perceived advantages of infusing misoprostol pre-breeding are that the mare in estrus is more capable (i.e., open cervix, low progesterone concentration, competent immune response, and uterine contractility) of dealing with potential secondary uterine infections introduced with the misoprostol infusion and that it is closer to the breeding time, thus allowing unilateral treatment of only one side in case the mares have one or more follicles located in one ovary. However, the ideal time point to administer misoprostol has not been critically investigated.

Recently, there have been growing concerns regarding misoprostol in clinical practice with mares since rare but severe anaphylactic reactions have been reported in mares immediately after infusion ^[14], requiring treatment with massive uterine lavage, corticosteroids, epinephrine, and intravenous fluids. However, it remains to be determined if mares developing systemic side effects to misoprostol do so due to the drug itself or for having underlying conditions triggered by misoprostol infusion. In addition, anecdotal reports suggested that misoprostol causes exacerbated uterine inflammatory response post-infusion; but this has not been critically studied to determine if these mares have undiagnosed endometritis or whether indeed misoprostol results in an exacerbated uterine inflammatory response.

Therefore, this study aimed to assess the inflammatory response and potential systemic reactions after uterine administration of misoprostol, either during pre-breeding or immediately after post-embryo flushing. We hypothesized that misoprostol does not exacerbate the uterine inflammatory response in mares.

2. MATERIALS AND METHODS

This study was revised and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Brasilia under protocol #23106.023841/2022-26. The study was conducted from November 2020 to May 2021.

Animals and husbandry

The study involved two experiments conducted with four estrous cycles of eleven Mangalarga Marchador, used as donors in an embryo transfer facility located in Planaltina, Federal District, Brazil (15°29'59.1"S 47°38'13.5"W). The mares ranged from 3 to 10 years old and weighed 350 to 450 kg. Before the onset of the study, the owner permitted us to enroll the animals in the study.

The mares were kept on tropical grass pasture in groups of three to four mares, with free access to water and supplemented with trace minerals. None of the mares used in the study had a history of subfertility or susceptibility to persistent breeding-induced endometritis. In addition, all mares had been used as embryo donors for at least one breeding season and were reported to have apparently good fertility.

Experiment 1. Uterine inflammatory response after pre-breeding infusion of misoprostol

Two estrous cycles of each mare were randomly assigned in a crossover design to receive misoprostol (3 mL LRS +200 µg) or sham (3 mL of lactate Ringer's solution; LRS) infusions, bilaterally deposited via deep-horn, at least 72h pre-breeding. Immediately before misoprostol or sham infusions, mares had uterine swabs and cytobrush collected for aerobic culture and cytologic evaluations, respectively, as described below. Also, uterine cytology was repeated 24h, 48h, and 72h after administration of misoprostol or sham.

The misoprostol infusion consisted of a single bilateral deep-horn application of one 200 µg tab of misoprostol (Misoprostol oral tab 200 µg, Greenstone, NDC 59762-5008-02) per uterine horn, diluted in 3 mL of LRS. The sham consisted of a single deep horn uterine application of the same volume of LRS on each uterine horn. Immediately before each application, the misoprostol tabs were crushed and then dissolved in LRS. For both sham and misoprostol infusions, the uterine administrations were performed when mares were coming into estrus, i.e., when a dominant follicle ≥ 28 mm in the presence of uterine edema score ≥ 1 was detected. After infusions, mares were observed for side effects such as swelling, tachypnea, and sudoresis.

Immediately before and then daily up to 72h after infusion, all mares had uterine ultrasonography performed to evaluate the uterus for the presence of uterine edema and fluid accumulation. Twenty-four after uterine infusion, each mare had a uterine lavage with 2 L of LRS. All mares received a dose of dinoprost to promote uterine contractility and

prevent intrauterine fluid accumulation. Thereafter, oxytocin was administered q12h, i.m., for three days.

Mares were bred at least 72 hours after misoprostol or sham infusions. Embryo flushing was performed eight- or nine-days post-ovulation as described below. The data associated with the breeding management, embryo recovery, and transfer results are described below. There were no wash-out cycles between sham and misoprostol cycles.

Experiment 2. Uterine inflammatory response after misoprostol immediately after embryo flushing in mares

Two estrous cycles of each mare were randomly assigned in a crossover design to receive misoprostol (3 mL +200 µg) or sham (3 mL of lactate Ringer's solution) infusions bilaterally deposited via deep-horn immediately after embryo flushing performed 8-9 days post-ovulation. The misoprostol and sham infusions were performed as described in experiment 1. After the end of experiment 1 and before the onset of experiment 2, mares had one breeding-embryo flushing cycle.

Immediately before misoprostol and sham infusions, mares had uterine swabs and cytobrush collected for aerobic culture and cytologic evaluations, respectively, as described below. Cytology was repeated daily for up to 72 h after misoprostol or sham infusions. Mares were assessed for side effects after misoprostol and sham uterine infusions. Similar to experiment 1, one uterine lavage was performed 24 h post-misoprostol or LRS deep-horn applications. Right after the lavage, each mare received a dose of Dinoprost (1mL, 5 mg, i.m., Lutalyse®, Zoetis). For three days, oxytocin was administered q12h, i.m. to prevent intrauterine fluid accumulation. Before the onset of the study and oxytocin administrations, mares were assessed for uterine edema and fluid accumulation for comparisons across groups. Following infusions, mares were monitored and bred in standard fashion with fresh, cooled, or frozen semen. Fertility rates of the estrous cycle following treatment were used for each group. The data associated with the breeding management, embryo recovery, and transfer results within the estrous cycle is described below. There were no wash-out cycles between sham and misoprostol cycles.

Breeding management and embryo flushing

Mares had transrectal palpation and ultrasonography examination performed every other day until early estrus (28-30 mm) was detected. After that, uterine culture and

cytology were obtained from each mare, and mares were examined daily until the follicle reached ≥ 35 mm in the presence of an endometrial edema score ≥ 1 . Mares with positive uterine cultures were treated with antibiotic therapy according to the antimicrobial susceptibility if needed. Once a ≥ 35 mm follicle and uterine edema >1 was detected, ovulation was hastened with 250 μg of histrelin acetate (1 mL, i.m., Strelin®, Botupharma, Botucatu, Sao Paulo, Brazil). Finally, mares were inseminated with fresh, cooled, or frozen semen from six Mangalarga Marchador stallions.

Embryo flushing was carried out eight or nine days after ovulation with LRS. The recovered uterine fluid was drained into a filter, and embryos were searched, located, separated, and graded ^[15]. Embryos were standardly transferred into cyclic recipients 4-7 days post ovulation.

Ultrasonography

Transrectal palpation and ultrasonography examination was performed with a portable ultrasound (SonoScape A5v, Domed, Sao Paulo, Brazil) coupled with a 5 MHz linear transducer. If intrauterine fluid accumulation was present, the fluid column's height and width (mm^2) were measured with the ultrasound caliper function at the uterine bifurcation. Endometrial edema was scored on each transrectal ultrasonographic examination on a scale of 0 (absent) to 4 (max) ^[16].

Endometrial cytology

Uterine cytology was performed pre- (0 h) and post-infusions (24, 48, and 72 h). The samples were obtained using a disposable cytobrush. Briefly, the cytobrush was inserted manually through the vagina and cervix into the uterus using a sterile sleeve. After collection, the slides were prepared and stained by Diff-Quick. The samples were then microscopically examined under 400 \times objective, and the number of inflammatory cells in ten higher power fields was counted. Finally, an evaluator blinded to the treatment assessed all the samples. Positive uterine cytology was defined as ≥ 3 -5 PMNs per high-power field.

Aerobic culture

Uterine culture swabs were transported in Stuart media to the microbiology laboratory of the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine of the University of Brasilia. Upon arrival, samples were streaked over blood agar, MacConkey, Cled and BHI broth for 24h at 37°C. When positive, isolates were identified using standard microbiological testing such as Mannitol media, Indol, VM, VP, Citrate, Urea, Phenyl, Ornithine, Glucose, Sucrose, KOH, Catalase, Gram staining and streaking over Cled, EMB, OF, and chromogenic agar. Muller Hinton media was used for the antimicrobial sensitivity test.

Statistical analyses

Data analyses were carried out with GraphPad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Time to AI and ovulation and PMN counting were evaluated with a mixed model and Tukey's post hoc test. Edema and uterine accumulation scores were tested by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test. Fertility rates, the number of positive bacterial cultures, and positive cytology were assessed using logistic regression analysis. Significance was set at $P \leq 0.05$ for all tests. All data are presented as mean \pm SD. The degree of linear correlation between the group, embryo recovery, culture, and PMNs counting was tested using Pearson correlation. Strong coefficient of correlation was defined as $r > 0.7$, moderate $0.5 \leq r \leq 0.7$, and weak correlation when $r < 0.5$.

3. RESULTS

Experiment 1

Seven cycles in the sham group were bred with frozen semen, three cycles were bred with chilled semen, and one cycle with freshly extended semen (Table 1). Five cycles in the misoprostol group were bred with frozen semen, and six cycles with freshly extended semen (Table 1). Uterine edema or intrauterine fluid accumulation was similar in both misoprostol and sham groups ($P > 0.05$). However, both the sham and misoprostol infusions increased the number of PMNs on uterine cytology for up to 48 h post-infusion ($P < 0.05$, Figure 1). In both groups, more mares were found to have positive uterine cytology at 24h after infusions ($P < 0.05$). However, in the misoprostol cycles, more mares

had positive uterine cytology at 0 and 48 h (Table 2, $P < 0.05$). There was no difference in the interval between treatment and AI (sham, 3.6 ± 0.7 days; and misoprostol, 3.5 ± 0.7 days) or ovulation (sham, 3.8 ± 0.9 days; and misoprostol, 4.0 ± 1.1 days) between both cycles ($P > 0.05$). The embryo recovery rates were similar between sham (45%, 5/11) and misoprostol cycles (45%, 5/11; $P > 0.05$). After embryo transfer, the percentage of mares confirming pregnant at 5 days post-transfer was 100% (5/5) and 80% (4/5) for sham and misoprostol cycles, respectively.

Experiment 2

Three cycles in the sham group were bred with frozen semen, and eight cycles were bred with freshly extended semen. Six cycles in the misoprostol group were bred with frozen semen, and five cycles with freshly extended semen (Table 3). Similar to mares treated pre breeding, misoprostol did not affect the uterine edema or intrauterine fluid accumulation in mares treated after embryo flushing ($P > 0.05$). However, PMNs counts increased 24 h after misoprostol and sham cycles ($P < 0.05$, Figure 2). At 48 h after misoprostol infusion, PMNs counts returned to baseline values and remained stable up to 72 h in the sham cycle ($P > 0.05$, Figure 2A), whereas PMNs were reduced in mares treated with misoprostol ($P < 0.05$, Figure 2B).

The number of mares with positive uterine cytology at each moment is highlighted in Table 4. The number of mares with positive uterine cytology did not change over time in the misoprostol group ($P > 0.05$). However, the incidence of positive uterine cytology 24 h after treatment was increased in the sham group compared to pre-infusion (0 h; $P < 0.05$). There was no difference in the intervals from infusion to breeding (sham, 6.6 ± 2.6 days; and misoprostol, 6.2 ± 2.4 days) or ovulation (sham, 7.5 ± 2.6 days; and misoprostol, 6.9 ± 2.3 days) between both cycles ($P > 0.05$). Embryo recovery rates were similar between sham (73%, 8/11) and misoprostol cycles (45%, 5/11; $P > 0.05$). After embryo transfer, the percentage of mares confirming pregnant five days post-transfer was 50% (4/8) and 100% (5/5) for sham and misoprostol cycles, respectively.

Combined analyses of experiments 1 and 2

None of the mares in the present study develop adverse reactions after treatments. Positive uterine cultures were observed in 64% (28/44) of the cycles used for this study. Bacteria isolated were *Escherichia coli* (7%), *Pseudomonas aeruginosa* (18%),

Staphylococcus aureus (18%), *Enterobacter* (18%), *Enterococcus* (7%), *Bacillus* (7%), *Corynebacterium* (4%), and mix isolated (21%). The percentage of positive aerobic bacterial cultures was similar in both groups and experiments ($P>0.05$). In addition, there were no associations ($P>0.05$) between cycles with a positive uterine culture and a positive embryo recovery ($r = 0.04$), positive uterine culture ($r = -0.02$), or positive uterine cytology ($r = 0.14$) and fertility.

Similarly, a positive embryo recovery was weak and negatively correlated ($r = -0.40$; $P<0.05$) with positive uterine cytology at 0h, and there were no associations between embryo recovery and a positive uterine culture ($r = 0.04$; $P>0.05$). The correlation between positive uterine cultures and the specific time points of each uterine cytology were: 0 h, $r = 0.20$; 24 h, $r = -0.11$; 48 h, $r = 0.14$; 72 h, $r = 0.21$ ($P>0.05$). Mares in experiment 2 had longer intervals from infusion to breeding or ovulation than mares in experiment 1 ($P<0.05$).

Discussion

The present study was set forth to assess the uterine inflammatory response and potential adverse reactions after intrauterine infusion of misoprostol in mares pre-breeding or after embryo flushing. None of the mares in the present study displayed systemic signs of adverse reactions, as previously reported [14], after misoprostol administrations in either experiment. In addition, the misoprostol did not exacerbate the uterine inflammatory response in mares when compared with sham.

Exacerbated uterine edema and intrauterine fluid accumulation are valuable parameters for clinically assessing mares inflammation [1,2]. Uterine infusion of misoprostol did not change these parameters compared to sham infusion in either experiment. In a recent study, deep-horn administration of misoprostol (200 $\mu\text{g}/\text{mare}$) did not increase uterine fluid accumulation when infused one or two days before breeding [18]. Intrauterine or cervical administration of misoprostol in mares did not result in side effects in other studies [12,13,17–19]. Severe allergic reactions (e.g., anaphylactic and anaphylactoid) may occur unexpectedly in animals prone and sensible to specific antigens [20–22]; thus, it is paramount to observe mares for at least 30-60 minutes for systemic reactions to misoprostol as there have been numerous unpublished reports of systemic reactions in mares with the gain in popularity of the technique.

The total misoprostol used in the present study was 400 $\mu\text{g}/\text{mare}$; many clinicians use 800 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mare}$ (i.e., 400-500 $\mu\text{g}/\text{uterine horn}$). In one clinical case that a mare

developed a severe systemic reaction to misoprostol; the dosage used was 1,600 µg/uterine horn [14]. It is possible that if a larger dose of misoprostol was used herein and elsewhere, mares could have displayed an exacerbated uterine inflammatory response or even side effects; however, this remains to be determined by further studies.

The embryo recovery did not change across groups or experiments herein; however, it is worth noting that none of the mares enrolled in the study did not have any clinical indication to be treated with misoprostol. Also, since a limited number of cycles and mares were used herein, the study was not set to evaluate embryo recovery but rather to evaluate the post infusion uterine inflammatory response. In addition, since the study was conducted under private practice conditions, mares were bred to six different stallions, with freshly extended, chilled-shipped, or frozen upon the farm manager's discretion. Yet, as the mares were infused pre-breeding or immediately after embryo flushing, the clinical parameters assessed herein were all performed before the next breeding cycle; therefore, no confounding effects were present.

A recent study did not observe differences in pregnancy rates in mares treated with misoprostol pre-breeding; however, the uterine inflammatory response was not evaluated [18]. However, mares tended ($P=0.07$) to have lower fertility than the sham group [18]; the authors also suggested that this tendency could be associated with the adverse effect of misoprostol on semen [18]. In the present study, mares were bred at least 72 h after misoprostol administration and had a uterine lavage performed 24 h post-misoprostol deep horn infusion. Conversely, mares in the European study were bred 24-48 h post-misoprostol, and it is not clear whether a uterine lavage was performed after misoprostol infusion.

The mammalian endometrium reacts to foreign particles and activates the innate immune response aiming to promote a healthy environment [1,27]. Although exacerbated uterine inflammation can be harmful to the establishment of pregnancy [28], uterine inflammation is a physiological phenomenon that is important for uterine clearance after antigen recognition [1,29]. The inflammatory cascade in the endometrium can be activated by either infectious agents (i.e., bacteria and fungus) or non-infectious agents such as sperm, chemicals, or excessive manipulation [25,26,29,30]. Exacerbated and delayed (e.g., >48-72 h) uterine inflammation is a concern in equine breeding programs [1,31]. In the present study, both the sham and misoprostol uterine infusions increased the PMNs counting in uterine cytology 24 h post-infusion in pre-breeding and post-embryo flushing cycles. It was unknown if this increment in PMNs counts was associated with the LRS used on both sham and misoprostol groups, or if it was due to the passage of the flexible

AI-pipette, which can also cause inflammation of the endometrium [25,26]. The two-time points for the misoprostol infusion used in the present study were chosen to mimic current standards in the equine breeding industry as mares are either infused with misoprostol during estrus (pre-breeding) or diestrus (post-embryo flushing).

Herein statistical comparisons were made between mares in experiments 1 and 2 in the interest of readership. However, as the study was carried out on a private commercial farm, the mares treated in diestrus had embryo flushing performed before misoprostol; therefore, the embryo flushing likely affected baseline PMN counts, uterine edema, and fluid before infusion of misoprostol; thus, preventing a true comparison between estrus (pre-breeding) vs. diestrus (post-embryo flushing). However, this study design did not limit the comparisons made within experiments between sham and misoprostol groups. Reports have been made with mares infused during estrus or diestrus [14, 18], but no study compared the same mares in the same timepoints as herein.

An unexpected finding of the present study was a large number of embryo donor mares with positive uterine cultures. This was unforeseen as none of the mares had a history or signs of endometritis [1,2]. Most uterine infections are caused by β -hemolytic *Streptococci* ssp. and *E. coli* in horses [1,2,23,24]. However, *Streptococci* ssp. was not isolated in any of the mares, and *E. coli* was detected in 7 % of the positive cultures. The high percentage of positive cultures coupled with less common bacteria could suggest contamination during sampling; or that the mares had chronic endometritis as all the isolates obtained herein have been reported in association with chronic endometritis (e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium*); and mares with chronic endometritis do not display overt clinical signs [1,2,23,24]. Having a positive culture before misoprostol or sham infusions was not associated with further inflammatory response herein. Therefore, none of the mares enrolled herein had a history of persistent breeding induced endometritis, and it is possible that the anecdotal reports of misoprostol causing exacerbated uterine inflammatory response were due to mares susceptible to endometritis over-reacting to misoprostol or the passage of the flexible AI pipette. This warrants further investigation.

In conclusion, misoprostol did not induce exacerbated uterine inflammation in mares or systemic adverse reactions when infused pre-breeding or immediately after embryo flushing. Sham and misoprostol infusions induced a transient inflammatory response resolved by 72 h post infusion.

Acknowledgments

This research was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). This study was part of the master thesis of the first author, in the Animal Biotechnology at the Sao Paulo State University.

Institutional Review Board Statement

This study protocol was approved by the University of Brasília Institutional Animal Care and Used Committee, #23106.023841/2022-26.

Conflict of Interest: None

Credit Author Statement

G. Amorim and O.M. Oliveira executed the study execution. LGTM Segabinazzi contributed to the study design, data analysis, interpretation, and manuscript preparation. Arruda R. and Simone P. contributed to the study execution and sampling analysis. I.F. Canisso contributed to the study design, interpretation, and manuscript preparation. All authors gave their final approval of the manuscript. I.F. Canisso served as the graduate adviser for the first author.

REFERENCES

- [1] Canisso IF, Segabinazzi LGTM, Fedorka CE. Persistent breeding-induced endometritis in mares — A multifaceted challenge: from clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. *Int J Mol Sci* 2020; 21:1432.
- [2] Canisso IF, Stewart J, Coutinho da Silva MA. Endometritis: managing persistent post396 breeding endometritis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2016; 32:465–80. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.004>.
- [3] Tsutsumi Y, Suzuki H, Takeda T, Terami Y. Evidence of the origin of gelatinous masses in the oviducts of mares. *J Reprod Fert* 1979; 57:287–90.
- [4] Liu I, Lantz K, Schclafke S, Bowers J, Enders A. Clinical observations of oviductal masses in the mare. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1990;36:41–5.
- [5] Zent WW, Liu IKM, Spirito MA. Oviduct flushing as a treatment for infertility in the mare. *Equine Vet J* 2010;25:47–8. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb04824.x>.
- [6] Arnold CE, Love CC. Laparoscopic evaluation of oviductal patency in the standing mare. *Theriogenology* 2013;79:905–10. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.004>.
- [7] Bennett S. Diagnosis of oviductal disorders and diagnostic techniques. In: Samper J, Pycock J, McKinnon A, editors. *Curr. Ther. equine Reprod.*, St. Louis, MO: WB Saunders Elsevier; 2007, p. 78–82.
- [8] Köllmann M, Rötting A, Heberling A, Sieme H. Laparoscopic techniques for investigating the equine oviduct. *Equine Vet J* 2011;43:106–11. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00143.x>.
- [9] Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN. Laparoscopic application of PGE2 to re-establish oviductal patency and fertility in infertile mares: A preliminary study. *Equine Vet J* 2006;38:454–9. <https://doi.org/10.2746/042516406778400628>.
- [10] Ortis HA, Foss RR, McCue PM, Bradecamp EA, Ferris RA, Hendrickson DA. Laparoscopic application of PGE2 to the uterine tube surface enhances fertility in selected subfertile mares. *J Equine Vet Sci* 2013;33:896–900. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.01.003>.
- [11] Inoue Y, Sekiguchi M. Clinical application of hysteroscopic hydrotubation for unexplained infertility in the mare. *Equine Vet J* 2018;50:470–3. <https://doi.org/10.1111/evj.12781>.
- [12] Alvarenga MA, Segabinazzi LG. Application of misoprostol as a treatment of unexplained infertility in mares. *J Equine Vet Sci* 2018;71:46–50. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.09.005>.
- [13] Alvarenga MA, Segabinazzi LGTM. How to use misoprostol (PGE1) application in deep-uterine horn to treat mares with unexplained infertility. *Am. Assoc. Equine Pract.*, Denver: 2019, p. 41–6.
- [14] Kiviniemi-Moore J. Anaphylactic reaction following intrauterine application of misoprostol in a mare. *Clini* 2021;13:317.
- [15] McCue PM, DeLuca CA, Ferris RA, Wall JJ. How to evaluate equine embryos. *Proc. 55th Am. Assoc. Equine Pract.*, Las Vegas, Nevada: 2009, p. 252–6.

- [16] Dooleweerd C, Roenn M, Miki A, Gervi H, Lehn-jensen H, Christoffersen M. Equine infectious endometritis - clinical and subclinical cases. *J Equine Vet Sci* 2015;35:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.12.002>.
- [17] McNaughten J, Pozor M, Macpherson M, Kelleman A, Woodward E, Troedsson M. Effects of topical application of misoprostol on cervical relaxation in mares. *Reprod Domest Anim* 2014;49:1057–62. <https://doi.org/10.1111/rda.12435>.
- [18] Donatsch L, Friker B, Sieme H, Kaeser R, Burger D. No increase in pregnancy rate of mares after preovulatory deep uterine horn application of misoprostol. *Theriogenology* 2022;184:132–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.03.005>.
- [19] Nie GJ, Barnes AJ. Use of prostaglandin E1 to induce cervical relaxation in a maiden mare with post breeding endometritis. *Equine Vet Educ* 2003;15:172–4. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2003.tb00237.x>.
- [20] Basile RC, Rivera GG, Del Rio LA, de Bonis TCM, do Amaral GPD, Giangrecco E, et al. Anaphylactoid reaction caused by sodium ceftriaxone in two horses experimentally infected by *Borrelia burgdorferi*. *BMC Vet Res* 2015;11:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0478-6>.
- [21] Eyre P. Pharmacological aspects of hypersensitivity in domestic animals: a review. *Vet Res Commun* 1980;4:83–98.
- [22] Simons FER. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:18–23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.981>.
- [23] Leblanc M, Causey R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Domest Anim* 2009;44:10–22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x>.
- [24] Ferris RA. Endometritis: diagnostic tools for infectious endometritis. *Vet Clin North Am - Equine Pract* 2016;32:481–98. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.001>.
- [25] Gomes GM, Crespilho AM, Leão KM, Jacob JCF, Gomes LPM, Segabinazzi LG, et al. Can sperm selection, inseminating dose, and artificial insemination technique influence endometrial inflammatory response in mares? *J Equine Vet Sci* 2019;73:43–7. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.09.010>.
- [26] Ferrer MS, Lyle SK, Paccamonti DL, Eilts BE, Hosgood G, Godke RA. Persistent breeding-induced endometritis after hysteroscopic insemination in the mare. *Reprod Domest Anim* 2012;47:732–9. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01951.x>.
- [27] Marth CD, Firestone SM, Hanlon D, Glenton LY, Browning GF, Young ND, et al. Innate immune genes in persistent mating-induced endometritis in horses. *Reprod Fertil Dev* 2018;30:533–45. <https://doi.org/10.1071/RD17157>.
- [28] Zent WW, Troedsson MHT, Xue J-L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. *Proc. 44th Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.*, vol. 44, 1998, p. 64–5.
- [29] Troedsson MH., Liu IK., Crabo B. Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology* 1998;49:905–15. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00040-5).
- [31] Troedsson MHT, Desvouses A, Macpherson ML, Pozor MP. Persistent breeding-induced endometritis. *Pferdeheilkunde*, vol. 24, Hippiafrika Verlagsgesellschaft; 1994, p. 56–60. <https://doi.org/10.21836/PEM20080112>.

Table 1. Descriptive breeding management of commercial embryo donor mares in experiment 1.

Mares#	Groups	Culture	AI type	PM (%)	Breeding dose	Viable	Embryo recovery and quality	Transfer results
1	Sham	Staphylococcus sp	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
1	Misoprostol	NMI	Fresh	55%	1.8×10^9	1×10^9	NER	-
2	Sham	Bacillus	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
2	Misoprostol	Bacillus	Fresh	70%	1.4×10^9	1×10^9	Blastocyst, grade 1	Pregnant
3	Sham	NMI	Chilled	40%	1×10^9	400×10^6	NER	-
3	Misoprostol	E. coli, Enterococcus, Enterobacter	Fresh	50%	2×10^9	1×10^9	NER	-
4	Sham	NMI	Frozen	50%	5 straws	250×10^6	Blastocyst	Pregnant
4	Misoprostol	NMI	Frozen	50%	5 straws	250×10^6	Blastocyst	Pregnant
5	Sham	NMI	Chilled	35%	1×10^9	350×10^6	Blastocyst	Pregnant
5	Misoprostol	NMI	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
6	Sham	Staphylococcus sp.	Chilled	35%	1×10^9	350×10^6	Blastocyst	Pregnant
6	Misoprostol	Enterococcus	Frozen	50%	5 straws	250×10^6	Blastocyst, grade 2	Not pregnant
7	Sham	Proteus, Enterobacter	Frozen	35%	3 straws	105×10^6	Blastocyst	Pregnant
7	Misoprostol	Staphylococcus sp.	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
8	Sham	Staphylococcus sp.	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
8	Misoprostol	E. coli	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
9	Sham	Enterobacter	Fresh	40%	2.5×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant
9	Misoprostol	Enterococcus	Fresh	45%	2.2×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant

Mares#	Groups	Culture	AI type	PM (%)	Breeding dose	Viable	Embryo recovery and quality	Transfer results
10	Sham	NMI	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
10	Misoprostol	Enterobacter, Enterococcus	Fresh	45%	2.2×10^9	1×10^9	NER	-
11	Sham	Pseudomonas	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
11	Misoprostol	Enterobacter	Fresh	45%	2.2×10^9	1×10^9	Blastocyst (2+)	Pregnant (2+)

PM, Progressive motility; NMI, no microorganisms isolated; NER, no embryo recovered. Breeding dose, Total Motility. Viable: progressive motile sperm.

Table 2. The number of mares with positive aerobic uterine cultures immediately before administration of misoprostol or sham infusions. Mares received misoprostol or sham when a ≥ 28 mm follicle in absence of a corpus luteum was first detected.

Groups	Timepoints			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Sham	9% (1/11) ^a	64% (7/11) ^b	36% (4/11) ^{ab}	27% (3/11) ^{ab}
Misoprostol	0% (0/11) ^a	73% (8/11) ^b	64% (7/11) ^b	27% (3/11) ^{ab}

Different superscripts (^{a,b}) denote the effects of time ($P < 0.05$).

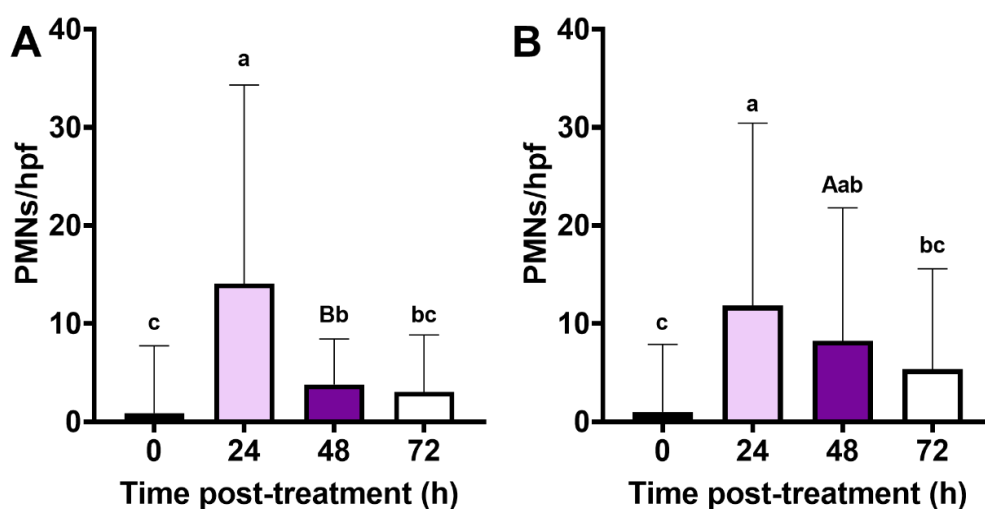


Figure 1. Mean polymorphonuclear cells (PMNs) assessed in 10 high-power fields (hpf) in endometrial cytology of mares treated pre-breeding (≥ 28 mm follicle in the presence of endometrial edema score ≥ 1). Mares ($n=11$) had estrous cycles ($n=22$) assigned to receive deep uterine horns sham infusions (A, $n=11$), or misoprostol (200 μg /per side) (B, $n=11$) in a cross-over design. Different superscripts denote the effects of time (^{a,b,c}) and differences between groups (^{A,B}) ($P < 0.05$).

Table 3. Descriptive breeding management of commercial embryo donor mares in experiment 2

Mares#	Groups	Culture	AI type	PM (%)	Breeding dose	Viable	Embryo recovery and quality	Transfer results
1	Sham	Corynebacterium	Fresh	60%	1.6×10^9	1×10^9	Blastocyst	Not pregnant
1	Misoprostol	Pseudomonas	Frozen	50%	5 straws	250×10^6	Blastocyst, grade 1	Pregnant
2	Sham	E. coli, Enterococcus	Fresh	45%	2.2×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant
2	Misoprostol	E. coli, Enterobacter	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
3	Sham	NMI	Fresh	45%	2.2×10^9	1×10^9	NER	-
3	Misoprostol	NMI	Fresh	45%	2.2×10^9	1×10^9	NER	-
4	Sham	NMI	Frozen	50%	5 straws	250×10^6	Blastocyst, grade 2	Not pregnant
4	Misoprostol	NMI	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
5	Sham	Enterobacter	Fresh	55%	1.8×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant
5	Misoprostol	Enterobacter	Fresh	50%	2×10^9	1×10^9	NER	-
6	Sham	Pseudomonas	Frozen	50%	5 straws	250×10^6	NER	-
6	Misoprostol	NMI	Fresh	60%	1.6×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant
7	Sham	Staphylococcus sp.	Frozen	50%	5 straws	250×10^6	NER	-
7	Misoprostol	Klebsiella, Enterobacter	Fresh	60%	1.6×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant
8	Sham	NMI	Fresh	60%	1.6×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant
8	Misoprostol	E. coli	Frozen	50%	5 straws	250×10^6	Blastocyst	Pregnant
9	Sham	Enterobacter	Fresh	50%	2×10^9	1×10^9	Blastocyst, grade 2	Not pregnant
9	Misoprostol	NMI	Fresh	60%	1.6×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant

Mares#	Groups	Culture	AI type	PM (%)	Breeding dose	Viable	Embryo recovery and quality	Transfer results
10	Sham	NMI	Fresh	60%	1.6×10^9	1×10^9	Blastocyst	Pregnant
10	Misoprostol	NMI	Frozen	20%	8 straws	160×10^6	NER	-
11	Sham	Pseudomonas	Fresh	50%	2×10^9	1×10^9	Blastocyst, grade 2	Not pregnant
11	Misoprostol	Pseudomonas	Frozen	10%	4 straws	40×10^6	NER	-

PM, Progressive motility; NMI, no microorganisms isolated; NER, no embryo recovered. Breeding dose, Total Motility. Viable: progressive motile sperm.

Table 4. The number of mares with positive uterine cultures before misoprostol and sham infusions. Mares received one infusion immediately after embryo flushing (8-9 days after ovulation).

Groups	Timepoints			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Sham	1/11 (9%) ^a	7/11 (64%) ^b	5/11 (45%) ^{ab}	1/11 (9%) ^a
Misoprostol	2/11 (18%)	4/11 (36%)	3/11 (27%)	1/11 (9%)

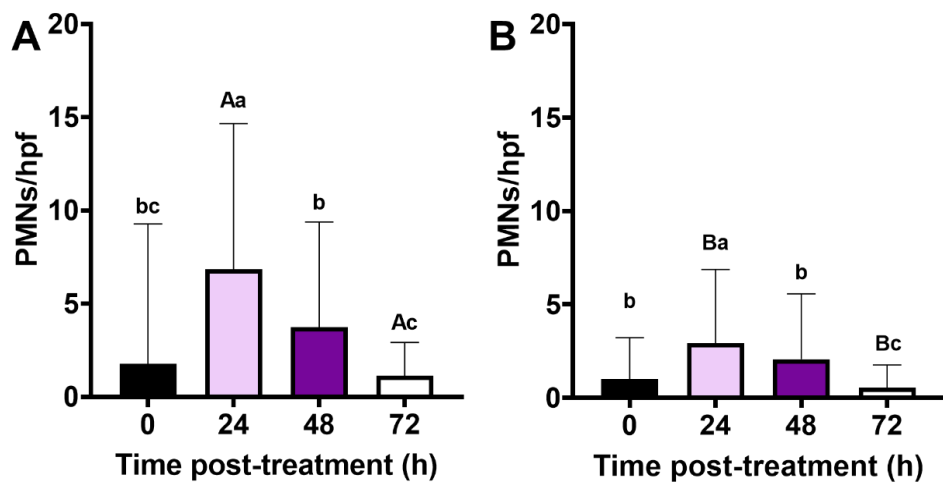


Figure 2. Mean polymorphonuclear cells (PMNs) assessed in 10 high-power fields (hpf) in endometrial cytology of mares treated after an embryo flushing. Mares (n=11) had estrous cycles (n=22) assigned to receive deep uterine horns sham infusion with Lactate Ringer' 's Solution (A, n=11), or 200 mcg of misoprostol (B, n=11) in a crossover design. Different superscripts denote the effects of time (^{a,b,c}) and differences between groups (^{A,B}) (P < 0.05).

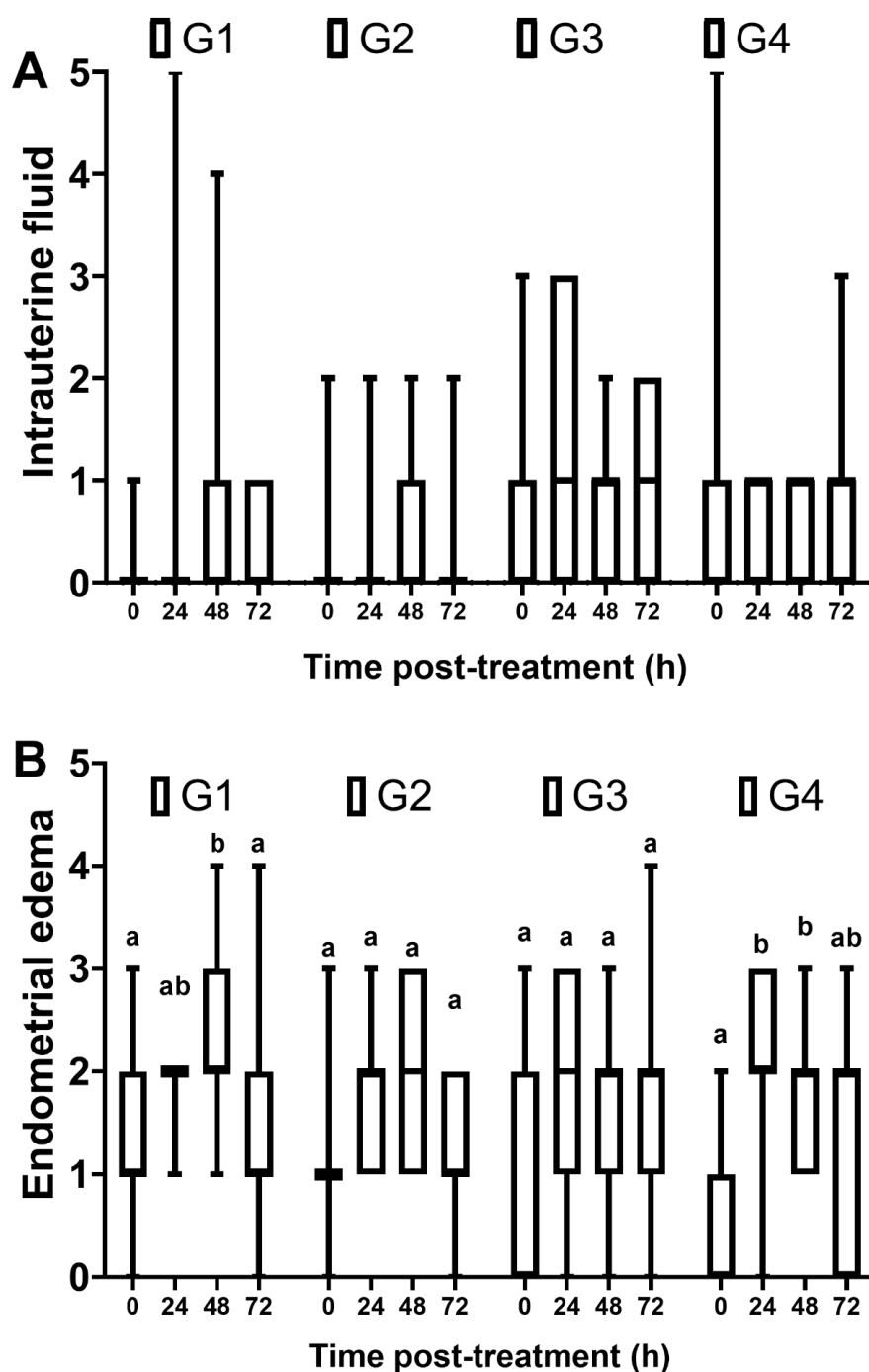


Figure 3. Intrauterine fluid accumulation and endometrial edema scores in mares treated with bilateral deep uterine horn infusion of 200 μ g of misoprostol or sham infusion (Lactate ringer, LRS). G1, mares were treated with sham infusion when ≥ 28 mm follicle and endometrial edema ≥ 1 were diagnosed; G2, mares were treated with infusion of 200 μ g of misoprostol when ≥ 28 mm follicle and endometrial edema ≥ 1 were diagnosed; G3, mares were treated with sham infusion immediately after embryo flushing (8-9 days after ovulation); G4, mares were treated with infusion of 200 μ g of misoprostol immediately after embryo flushing (8-9 days after ovulation). Uterine fluid: 0, absence of fluid; 1, <10 mm of fluid column; 2, 10 to 20 mm of fluid column; 3, 21 to 30 mm of fluid column; 4, 31 to 40 mm of fluid column; 5, >40 mm of fluid column. Endometrial edema: 0 (absent) to 4 (max) [16]. Different superscripts denote the effects of time (^{a,b,c}) ($P < 0.05$). Data are expressed as medians \pm 95% CL.