

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

EFEITO DA PENTOXIFILINA ORAL NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA E ACÚMULO DE FLUIDO INTRAUTERINOS  
APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E TAXA DE RECUPERAÇÃO  
EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS VELHAS

ODILON MARQUEZ DE OLIVEIRA

Botucatu - SP

Maio, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

EFEITO DA PENTOXIFILINA ORAL NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA E ACÚMULO DE FLUIDO INTRAUTERINOS  
APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E TAXA DE RECUPERAÇÃO  
EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS VELHAS

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus  
de Botucatu, Unesp, para obtenção do  
título de Mestre no Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia Animal.

Odilon Marquez de Oliveira

Orientador: Igor Frederico Canisso

Botucatu - SP

Maio, 2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Odilon Marquez de.

Efeito da pentoxifilina oral na resposta inflamatória e acúmulo de fluido intra-uterinos após inseminação artificial e taxa de recuperação embrionária / Odilon Marquez de Oliveira. - 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. Transferência de embriões. 3. Endometrite. 4. Fertilidade. 5. Pentoxifilina.

Palavras-chave: Doadoras de embrião; Endometrite; Fertilidade; Fluido uterino; Suplemento.

Nome do Autor: Odilon Marquez de Oliveira

Título: Efeito Da Pentoxifilina Oral Na Resposta Inflamatória E Acúmulo De Fluido Intrauterinos Após Inseminação Artificial E Taxa De Recuperação Embrionária Em Éguas Velhas

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 gostaria de agradecer ao maravilhoso Deus, meu refúgio e minha fortaleza, por permitir a concretização dos meus sonhos.

Agradeço pelo amor e apoio incondicional da minha família. Meus queridos pais por toda o suporte, conselhos, dedicação e amor. À minha esposa, minha companheira, Gabrielle Amorim, que tanto me ajuda e me da forças.

Aos brilhantes professores pelos ensinamentos, oportunidades e pela amizade: Rodrigo Arruda, Simone Perecmanis, José Dell’Aqua, Camilla Dell’Aqua, Ana Liz, Igor Canisso, Cezinande de Meira, Marco Alvarenga, Lorenzo e Lígia Mota.

Agradeço aos meus colegas e amigos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente no decorrer desse mestrado, tornando esse período mais ameno.

Também agradeço aos animais envolvidos no estudo, pois, sem eles, nada disso seria possível.

A instituição “Faculdade Estadual Paulista - UNESP” pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

OLIVEIRA, O.M. **Efeito da pentoxifilina oral na resposta inflamatória e acúmulo de fluido intrauterinos após inseminação artificial e taxa de recuperação embrionária em éguas velhas.** Botucatu, 2022. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

A maioria das éguas doadoras de embrião tem a limpeza uterina prejudicada devido a problemas uterinos e cervicais como resultado de repetidas inseminações e coletas de embrião. Esses problemas levam à suscetibilidade à endometrite persistente pós cobertura (EPPC) que está associada à inflamação persistente, que mostra edema uterino excessivo, acúmulo de líquido intrauterino (FIU), grande número de neutrófilos polimorfonucleares na citologia e cultura positiva. A intensa e prolongada inflamação endometrial cria um ambiente uterino desfavorável ao desenvolvimento embrionário, resultando em queda na fertilidade. A pentoxifilina é um fármaco reolítico, que promove aumento da maleabilidade das hemácias, e apresenta efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Sendo amplamente utilizado na prática clínica equina e na reprodução por aumentar o fluxo sanguíneo para os diversos tecidos. Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta inflamatória uterina pós inseminação artificial e a recuperação embrionária de éguas doadoras velhas e subférteis tratadas com pentoxifilina. Doze éguas ( $16 \pm 3,7$  anos) foram classificadas como suscetíveis ou resistentes à EPPC com base no histórico reprodutivo, nos achados ultrassonográficos e na taxa de recuperação embrionária. No início do estudo, uma amostra de biópsia foi coletada para determinar o score de biópsia do padrão Kenney e Doig. Cada égua foi submetida a seis ciclos estrais. Durante os dois primeiros ciclos, todas as éguas receberam, por via oral, 50mL de um suplemento comercial acrescido de 17mg/kg/dia de Pentoxifilina. Os dois ciclos subsequentes foram usados como washout (sem suplemento, sem pentoxifilina). Nos dois últimos ciclos, 50mL de suplemento comercial puro foi administrado por via oral. As coletas de embrião foram realizadas oito ou nove dias após ovulação. A palpação transretal e a ultrassonografia foram realizadas diariamente para avaliar o controle folicular, edema endometrial e acúmulo de fluido intrauterino. A citologia endometrial foi realizada pré e pós (24, 48 e 72h) inseminação artificial, enquanto a cultura uterina foi realizada pré e 72h pós inseminação. As contagens de neutrófilos relacionada aos efeitos do tempo não diferiram entre os grupos, bem como o edema uterino, o acúmulo de fluido intrauterino e a cultura positiva ( $P > 0,05$ ). A recuperação embrionária foi maior no grupo pentoxifilina ( $P = 0,046$ ). Em conclusão, a suplementação com pentoxifilina pode ser uma alternativa para diminuir a resposta inflamatória endometrial pós inseminação artificial e pode melhorar a taxa de recuperação embrionária.

**Palavras-chave:** Éguas, transferência de embriões, endometrite, fertilidade, pentoxifilina.

OLIVEIRA, O.M. **Effects of oral pentoxifylline on intrauterine inflammatory response and fluid accumulation after artificial insemination, and embryo recovery rate in old mares.** Botucatu, 2022. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## ABSTRACT

Most embryo donor mares have impaired uterine clearance due to uterine and cervical problems as a result of repeated breeding and embryo flushing. These issues lead to susceptibility to persistent breeding induced endometritis (PBIE) that is associated with persistent inflammation, which shows excessive uterine edema, intrauterine fluid accumulation, large number of polymorphonuclear cells on cytology and positive culture. Intense and prolonged endometrial inflammation creates an unfavorable uterine environment for embryonic development, resulting in a decrease in fertility. Pentoxifylline is a reolytic drug that promotes increased blood cells malleability and has anti-inflammatory and antioxidant effects. Being widely used in equine clinical practice and also in reproduction by increasing blood flow to the various tissues. This study aimed to assess the post-breeding inflammatory response and embryo recovery of sub fertile aged donor mares treated with pentoxifylline. Twelve mares ( $16\pm 3.7$  years old) were classified as susceptible or resistant to PBIE based on the reproductive history, ultrasound findings and embryo recovery rate. At the beginning of the study a biopsy sample was taken to determine the Kenney and Doig biopsy score. Each mare was submitted to six estrous cycles. During the first two cycles, all mares received orally, 50mL of a commercial supplement added with 17mg/kg/day of Pentoxifylline. The two subsequent cycles were used as washout (no supplement, no pentoxifylline). The two last cycles, 50mL of plain commercial supplement was orally administered. Embryo flushing was carried out eight or nine days after ovulation. Transrectal palpation and ultrasonography were performed daily to assess follicular control, endometrial edema and intrauterine fluid accumulation. Uterine cytology was performed pre and post (24, 48, and 72h) artificial insemination while uterine culture was performed pre and 72h post insemination. Neutrophil counts related to the effects of time did not differ between groups, as well as uterine edema, intrauterine fluid accumulation and positive culture ( $P>0.05$ ). Embryo recovery was greater in the pentoxifylline group ( $P=0.046$ ). In conclusion, supplementation with pentoxifylline may be an alternative to decrease the inflammatory endometrial response after artificial insemination and may enhance embryo recovery rate.

**Keywords:** Mares, embryo transfer, endometritis, fertility, pentoxifylline.

## SUMARIO

	<b>Página</b>
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Endometrite.....	3
2.1.1. Endometrite infecciosa.....	4
2.1.2. Endometrite não infecciosa.....	6
2.1.3. Resposta imune inata.....	6
2.1.4. Métodos diagnósticos.....	11
2.1.4.1. Ultrassonografia.....	11
2.1.4.2. Citologia.....	12
2.1.4.3. Cultura.....	14
2.1.4.4. Biópsia.....	15
2.1.5. Tratamentos.....	16
2.2. Pentoxifilina.....	19
2.3. Nutracêuticos.....	22
3. CONCLUSÃO.....	24
4. REFERÊNCIAS.....	25
HIPÓTESE E OBJETIVO.....	42
CAPÍTULO 2.....	43
ARTIGO - Oral supplementation with pentoxifylline in post breeding inflammatory response and embryo recovery rate in old mares.....	44

# **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

Com o intuito de aumentar o número de descendentes de animais de alto valor zootécnico para obtenção de futuros atletas e campeões, a espécie equina vem sendo selecionada geneticamente pela performance atlética e não pelo desempenho reprodutivo. Com o avanço da idade de fêmeas campeãs e produtoras, os índices reprodutivos caem juntamente com a fertilidade, fazendo com que as técnicas de reprodução assistida sejam cada vez mais estudadas e utilizadas para minimizar os efeitos do envelhecimento sobre a anatomia e barreiras de proteção naturais do trato reprodutivo da égua, bem como para reduzir os danos causados pela resposta imune uterina exacerbada em éguas susceptíveis (Ignácio et al., 2021).

A resposta inflamatória uterina após inseminação é fisiológica e transitória, todavia pode se tornar intensa e prolongada nas éguas susceptíveis (Segabinazzi et al., 2021). A presença de acúmulo de fluido intrauterino 24 a 48 horas após inseminação classifica a égua clinicamente como susceptível à endometrite (Canisso et al., 2016).

Éguas susceptíveis a endometrite persistente pós cobertura não são capazes de eliminar o processo inflamatório entre 48 e 72 horas após inseminação e podem apresentar repetição de cio, acúmulo de fluido intrauterino pré ou pós inseminação, edema uterino exacerbado, grande número de neutrófilos polimorfonucleares, predispondo o útero à infecções (Tongu et al., 2021; Bucca et al., 2008).

Após 5.5-6.5 dias da fertilização, o concepto chega ao útero (Betteridge et al., 1982). Todavia, a presença de produtos inflamatórios, fluido e bactérias torna o microambiente uterino incompatível com a sobrevivência embrionária e manutenção da prenhez (Troedsson., 1999).

De grande impacto econômico à indústria equina, a endometrite é a terceira enfermidade mais comum que acomete os equinos, a maior causa de redução de fertilidade e está associada a falha na concepção e perda embrionária precoce (Díaz-Bertrana et al., 2021; Segabinazzi et al., 2020).

Os nutracêuticos tem sido amplamente utilizados para melhorar os índices reprodutivos e incluem suplementos, vitaminas, minerais, bioprodutos e substâncias farmacêuticas. Porém, o resultado dessa suplementação é variável e sofre influências individuais e ambientais (Freitas et al., 2018).

A pentoxifilina promove o aumento do remodelamento das hemácias permitindo aumento na circulação e vascularização de diversos tecidos no organismo (Brisko et al., 2011); possui efeito antioxidante e anti-inflamatório (Pollice et al., 2001) e reduz a resposta inflamatória (Pozor., 2011), podendo facilitar o desempenho uterino frente à inflamação, e desta forma, diminuir a colonização de bactérias (Baumgartner, 2007).

O presente trabalho buscou revisar e avaliar os efeitos da pentoxifilina sobre a reação inflamatória após inseminação artificial e taxa de recuperação embrionária em éguas idosas que apresentam endometrite persistente pós cobertura.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Endometrite**

A endometrite pode estar associada a infecção por bactérias e fungos ou sêmen após inseminação, tornando-se de natureza multifatorial, o que dificulta o diagnóstico (Canisso et al., 2016).

De acordo com Ferris (2017) o útero da égua sadia tem capacidade de limpeza contra bactérias e fungos sem desenvolver infecção, porém, torna-se susceptível quando há alguma falha nos mecanismos de defesa do organismo, como má conformação perineal, esfíncter vestibulo vaginal danificado, defeito de cérvix, útero penduloso ou com saculação ventral, má condição/score corporal, atividade miometrial prejudicada ou defesa imunológica deficiente (Troedsson et al., 2018).

Após 30 minutos da deposição de sêmen no lúmen uterino, o sistema imune responde com quimiotaxia e ativação dos neutrófilos, com o intuito de fagocitar debris, bactérias e células espermáticas não viáveis (Canisso et al., 2016). Todavia, o pico da inflamação endometrial após inseminação ocorre

entre 12h e 24h com infiltração de neutrófilos polimorfonucleares, podendo alterar o microambiente uterino e diminuir a sobrevivência embrionária, contribuindo com a queda na fertilidade (Card, 2005; Díaz-Bertrana et al., 2021).

A resposta inflamatória uterina prolongada, até 96 horas, observadas nas éguas susceptíveis, diminui o tempo para resolução da inflamação uterina (Segabinazzi et al. 2020; Zent et al. 1998). A neutrofilia persistente, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e acúmulo de fluido no lúmen uterino criam um ambiente hostil com fatores embriotóxicos (Knutti et al., 2010; Robertson et al., 2018) com potencial para prejudicar a migração embrionária da tuba uterina para o útero, que acontece entre 144 e 168 horas após a ovulação (Freeman et al., 1991).

Hiperemia de cérvix, edema uterino excessivo, fluido presente no lúmen uterino durante o diestro, grande volume ou fluido ecogênico no lúmen uterino durante o estro e são fortes sinais clínicos que sugerem endometrite. Esse extravasamento do exsudato do interstício para o lúmen ocorre devido ao aumento da permeabilidade do endométrio inflamado, resultado da dilatação venosa e constrição de arteríolas (Segabinazzi et al., 2021).

### **2.1.1. Endometrite Infeciosa**

As éguas resistentes, prontamente respondem à presença de microrganismos oportunistas, todavia a resposta imune e drenagem uterina inadequadas, nas éguas susceptíveis, podem levar à infecção (LeeBlanc et al., 2009; Overbeck et al., 2011).

A endometrite bacteriana pode ser classificada como aguda, quando uma égua desenvolve uma infecção após exposição ao patógeno, e crônica, quando mesmo após terapia adequada, a infecção persiste (Ferris, 2017).

Éguas com endometrite aguda apresentam-se sistematicamente saudáveis, podendo apresentar líquido intrauterino e descarga vulvar, porém, pode ser uma resposta fisiológica normal, ou seja, uma inflamação transitória

que tem por objetivo a limpeza uterina de debris, bactérias, fungos, células espermáticas e plasma seminal (Canisso et al., 2016).

As bactérias patogênicas mais comumente encontradas no útero são: *Streptococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* e *Klebsiella sp.*. Outros microrganismos como: *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Serratia sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Actinetobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, *Pasteurella sp.* e anaeróbicos apresentam patogenicidade questionável (Ferris et al., 2016; Díaz-Bertrana et al., 2021).

LeBlanc (2010) aponta que essa grande lista de microrganismos de patogenicidade questionável, quando em crescimento pesado, pode levar à infecção uterina. E o crescimento das colônias nas placas de cultivo está ligada à severidade da infecção no útero (Wolfsdorf, 2016).

As endometrites crônicas podem estar associadas com a produção de biofilme, das quais as bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella sp.* são hipotetizadas como causadoras (Díaz-Bertrana et al., 2021). *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* e *Streptococcus sp.* são considerados microrganismos oportunistas, podendo residir no trato genital da fêmea, como vagina, vestíbulo e fossa do clitóris.

As bactérias planctônicas não sintetizam biofilme, entretanto emitem sinalização celular (di-GMP cíclico) que regulam a produção de alginato de exopolissacarídeos Pel e Psl (Anwar et al., 1992; Kuchma et al., 2005; Mah et al., 2001; Merighi et al., 2007). Estes, por sua vez, estão envolvidos na estabilização do DNA extracelular e fixação da bactéria ao substrato (Ma et al., 2006; Vasseur et al., 2005).

A mudança do estágio planctônico para biofilme confere maior resistência às terapias antimicrobianas e maior habilidade de fugir do sistema imune (Anwar et al., 1992; Mah et al., 2001; Mustoe, 2004; Shah et al., 2006) Devido a formação de um agregado complexo de microrganismos e suas secreções (Ferris, 2014; Ferris, 2017).

A presença de infecção persistente ancorada profundamente no endométrio pode acontecer em éguas que apresentam cultura negativa,

seguida de cultura positiva que pode proliferar em condições de estresse (Nocera et al., 2021), além de poder induzir resistência desses patógenos à terapia tradicional (Segabinazzi et al., 2020).

### **2.1.2. Endometrite não infecciosa**

A resposta imune inata e a adaptativa ou adquirida compõem o sistema imune da mucosa do trato reprodutivo da fêmea. Sendo que a adaptativa é seletiva e gera resposta mediada por linfócitos T, a partir da detecção de um antígeno (Canisso et al., 2014). Já a resposta imune inata é rápida, limitada, não específica e apresenta resposta transitória, após inseminação ou cobertura, iniciada por receptores Toll-like (TLRs), imunoglobulinas e complemento. De forma que ocorra eliminação dos antígenos por digestão leucocítica, independente de sua patogenicidade (Janeway et al., 2002; Medzhitov et al., 1998).

A prostaglandina E, o fator de crescimento beta e ligantes de TLR4 são fatores importantes encontrados no fluido seminal do macho que auxiliam no desvio ou tolerância imunológica (Fedorka et al., 2019). Essa supressão inicial da inflamação é necessária e permite que os espermatozoides percorram o útero e alcancem o oviduto, local onde ficarão armazenados até a fertilização (Scott et al., 1995; Thomas et al., 1994).

O desenvolvimento de um ambiente uterino imunotolerante também é crucial para a implantação embrionária (Aluvihare et al., 2004; Moldenhauer et al., 2009; Somerset et al., 2004). Sendo mediada pelas células T reguladoras (Treg Cells) que fazem parte dos linfócitos T (Moldenhauer et al., 2009; Schjenken et al., 2015). Os dois subtipos das Treg Cells, CD4+ e CD8+, apresentam propriedades que suprimem a inflamação uterina pela diminuição de citocinas, função dos macrófagos, linfócitos B e T, células dendríticas e natural killer (NK) (Jorgesen et al., 2019; Sakaguchi, 2000; Shevach, 2002).

### **2.1.3. Resposta imune inata**

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa e é ativada após partículas ou antígenos serem detectados, reconhecidos e posteriormente, sinalizados pelas células epiteliais endometriais (Marth et al., 2018; Nash et al.,

2015). Quando essa defesa está prejudicada, o útero não consegue eliminar, de forma eficiente, os microrganismos introduzidos durante a inseminação artificial ou cobertura (Segabinazzi et al., 2020).

A resposta imune inata apresenta várias funções e eventos. Barreira física contra partículas invasoras e microrganismos, apresentação de antígeno para que o sistema imune adquirido seja ativado, ativação de citocinas e quimiocinas para que células do sistema imune sejam recrutadas para o sítio da infecção e ativação da cascata de complemento para que haja clearance fagocítico não específico de células degeneradas e/ou mortas e micróbios (Segabinazzi et al., 2020).

Uma série de reações biológicas é mediada pela cascata de complemento e tem como objetivo principal defender o trato reprodutivo da égua contra agentes invasores (Troedsson, 1999). A ativação do sistema complemento antecipa a resposta inflamatória e auxilia na quimiotaxia de células inflamatórias e opsonização nas secreções uterinas (Hakansson et al., 1993; Kumar, 2019). Na presença dessas opsoninas, os PMNs ativados fagocitam debris, espermatozóides e bactérias (Thomas et al., 1994).

A via clássica do complemento é iniciada após a clivagem enzimática da Subunidade C2 em C2a e C2b, e da Subunidade C4 em C4a e C4b. A conversão de C3 decorre mediante a associação de C4b com C2b. Em seguida, C3 é clivada em C3a e C3b, onde C3a contribui para o recrutamento de leucócitos e ativação do complemento. A C3b, por sua vez, se liga ao C4b permitindo a ativação de imunoglobulinas e ligação a superfície de micróbios. (Grossman et al., 2016; Weiler et al., 1976; Nonaka, 2014).

O complexo de ataque a membrana (CAM) é o resultado de uma mudança na conformação após a conversão de C5 em C5a e C5b, no qual, C5b interage com os componentes terminais (C6, C7, C8 e C9) criando poros na membrana plasmática e causando lise dessas células alvo (Rus et al., 2005; Walport, 2001). A proteína C3b pode se ligar diretamente aos antígenos, criando uma via alternativa na cascata de complemento. Esse fator tem sido observado nas secreções uterinas de éguas susceptíveis e resistentes (Meri, 2016; Watson et al., 1987; Watson, 1988).

As células epiteliais do endométrio possuem receptores padrão (PRRs) que reconhecem e detectam antígenos de espermatozoides, proteínas do plasma seminal e micróbios, induzindo a cascata complemento e aumentando a síntese de prostaglandinas, leucotrienos, TOL, C3b e C5a, macrófagos e naturais killer, o que resulta em quimiotaxia de PMNs para o lúmen uterino (Crovim et al., 2012; Marth et al., 2018; Mitchell et al., 1982; Pycock et al., 1990; Watson et al., 1987). As citocinas são capazes de ativar de formas diferentes a quimiotaxia de células imune; e as quimiocinas recrutam os leucócitos para o local da inflamação (Kitaya et al., 2011).

As células NK, dendrídicas e macrófagos apresentam antígenos (ACP) após reconhecimento de moléculas de patógenos (PAMPs). Os receptores Toll-like (TLRs) das células endometriais são capazes de reconhecer esses antígenos e desencadear uma reação inflamatória (Janeway et al., 2002; Souza-Fonseca-Guimarães et al., 2012; Takeda et al., 2004; Turner et al., 2012). Os TLRs tipo 2 (TLR2) reconhecem lipopeptídeos de bactérias gram-positivas e o tipo 4 (TLR4) reconhecem e reagem com lipopeptídeos de bactérias gram-negativas (Chow et al., 1999; Sheldon et al., 2009). Já os receptores NOD-like (NLR), do grupo PRRs, expressos pelas células imune e epiteliais são responsáveis pela detecção de patógenos intracelulares (Franchi et al., 2009).

O início da cascata inflamatória ocorre através da ativação de TLRs, estimulando o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) (Lawrence, 2009; Takeda et al., 2004), que, por sua vez, ativa a codificação de genes para citocinas pró-inflamatórias, incluindo ciclooxigenase-2 (COX-2) e as quimiocinas que modulam a resposta inflamatória aguda (Chandrasekhalan et al., 2004; Girling et al., 2007; Takeda et al., 2004).

As citocinas são sintetizadas como pré-moléculas no início e podem ser ativadas pelas caspases (Van De Craen et al., 1999). As citocinas também modulam a resposta inflamatória uterina após inseminação, porém, as éguas susceptíveis apresentam menor expressão de mRNA de IL-10 (citocina anti-inflamatória) e maior expressão de IL-6 (citocina pro-inflamatoria), TNF $\alpha$ , IL1RA, IFN $\gamma$  (interferon gama) levando a diminuição de resposta aos

patógenos e às células inviáveis, levando a uma inflamação intensa e prolongada, e por consequência à infertilidade (Canisso et al., 2016; Fumuso et al., 2003).

A IL-6 pro-inflamatória está envolvida na inflamação aguda no endométrio e pode induzir o aumento da inflamação com a modulação de outras citocinas inflamatórias, como as IL1RN (Diao et al., 2005; Xing et al., 1998). Atreya et al. (2000) e Jones (2005) ainda sugerem que a IL-6 pró-inflamatória 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 tanto em processos reprodutivos normais, quanto em patologias com envolvimento de dano tecidual, se hiperativada (Gerard et al., 2004; Martoriato et al., 2003; Van Der Hoek et al., 1998).

Em comparação com éguas resistentes, as éguas susceptíveis apresentam maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL1 $\beta$ , CXCL8 e TNF $\alpha$ ) antes e após a exposição de espermatozoides ou patógenos. O estímulo inflamatório através da síntese de prostaglandinas, IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  ativam as células endoteliais vasculares, a qual aumentam as expressões de P-selectina que se liga a L-selectina na superfície dos neutrófilos, induzindo a quimiotaxia. Os neutrófilos sintetizam integrinas, que se ligam à moléculas de adesão nas células endoteliais até que haja adesão completa às paredes dos vasos sanguíneos. Resultando em aumento da permeabilidade vascular devido à dilatação das vênulas e constrição das arteríolas, com consequente 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).

Zerbe et al. (2003) avaliou o pico da migração de PMNs para o lúmen uterino após a indução de IL-8, em éguas susceptíveis após 6 horas da inseminação. Essa correlação direta entre o aumento da expressão de IL-8 com a infiltração de PMNs ainda não está clara, uma vez que as éguas susceptíveis podem apresentar processos fibróticos degenerativos no endométrio e prejudicar a migração dos PMNs (Woodward et al., 2013).

Os neutrófilos migram para o lúmen uterino após 30 minutos da deposição do sêmen e o pico da resposta inflamatória ocorre entre 6 e 12 horas nas éguas resistentes (Katila, 1995; Troedsson, 1999), porém nas éguas susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura (EPPC) a neutrofilia acontece em 2 a 12 horas após (Woodward et al., 2013).

Também é formada uma armadilha extracelular de neutrófilos (NETs) para auxiliar no clearance uterino, eliminação de bactérias e na liberação de mediadores inflamatórios (Canisso et al., 2016; Rebordão et al., 2014). Os NETs são induzidos por complexos antígenos-anticorpos, espécies reativas de oxigênio, CXCL8, lipólise e outros agentes inflamatórios, e apresentam propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Garcia-Romo et al., 2011; Logters et al., 2009). Um decréscimo na degradação da rede de neutrófilos extracelular ou uma super estimulação na formação dessa rede podem aumentar as chances de fibrose endometrial e prejudicar a função secretora do endométrio (Canisso et al., 2016).

O aumento nas citocinas anti-inflamatórias é observado em 2 a 6 horas após inseminação nas éguas resistentes, esses mecanismos são importantes para que ocorra a resolução do processo inflamatório e para que não haja danos teciduais (Cyktor et al., 2011; Woodward et al., 2013). As citocinas IL-10, IL-1RN, IL-4 e IL-13 são anti-inflamatórias, inibem a produção de mediadores pró-inflamatórios ou causam a morte celular, auxiliando no equilíbrio dos efeitos pró e anti-inflamatórios (Carnevale et al., 2000; Christoffersen et al., 2012; Couper et al., 2008; Opal et al., 2000). Equilíbrio este observado nas éguas resistentes, onde as citocinas pró-inflamatórias ativam e levam ao aumento da resposta, enquanto as citocinas anti-inflamatórias modulam as citocinas pró-inflamatórias (Hackett et al., 2008; Parhan, 2005).

Troedsson et al. (1993) hipotetizaram falha na resposta anti-inflamatória pela diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias nas éguas susceptíveis a EPPC. Prejudicando a duração, a intensidade e a frequência das contrações miométriais. A incapacidade da égua em contrair o útero de maneira eficiente reduz a eliminação de contaminantes e fluidos

(Ferris, 2017). Canisso et al. (2016) demonstra que a eliminação de fluido e espermatozoides através da cervix fica prejudicada nas éguas susceptíveis a endometrite, tanto pela inabilidade de contração miometrial induzida por PGF2alfa do endométrio e membranas de PMNs ativados, quanto pelo aumento da produção de um relaxante muscular potente, o óxido nítrico. (Griscavage et al., 1996; Liu et al., 1997).

Com a redução da atividade miometrial nas éguas susceptíveis, a migração de PMNs para o lúmen uterino pode ser mais lenta. E quando existe aumento e persistência de PMNs no endométrio, a inflamação se prolonga (LeeBlanc et al., 1994; Troedsson et al., 1993).

A habilidade contrátil do útero em promover drenagem mecânica através da cérvix relaxada contribui para o clearance de produtos inflamatórios e bactérias (LeeBlanc et al., 1994). Além de ser um mecanismo de defesa importante para prevenir a inflamação persistente e os danos causados no endométrio (Katila, 1995).

#### **2.1.4. Métodos Diagnósticos**

As patologias uterinas podem ser avaliadas por ultrassonografia transretal (Ginther et al., 1984) e por outros métodos diagnósticos como: biópsia, citologia e cultura uterinas. Esses métodos de avaliação também auxiliam na identificação do grau de inflamação e na detecção de organismos no lúmen uterino (Ferris, 2016). De acordo com Ferris et al. (2015) uma cultura microbiológica positiva não está sempre associada com a presença de células inflamatórias na citologia, porém, Overbeck et al. (2011) mostrou que a associação do estudo citológico com cultura microbiológica reduz os resultados falso negativos.

##### **2.1.4.1. Ultrassonografia**

A palpação transretal e a ultrassonografia são os métodos mais antigos de avaliação anatomofisiológica e de diagnóstico de patologias uterinas (Ginther et al., 1984); e a partir deles, são mensurados diâmetro dos cornos

uterinos, edema endometrial e acúmulo de fluido intrauterino (Tunon et al., 1995), bem como os reflexos da dominância do estrógeno e da progesterona sobre o útero e sobre o edema endometrial (Cuervo-Arango et al., 2010).

A ausência ou a presença de fluido intrauterino não são indicativos de ausência de inflamação ou indicativo de endometrite, respectivamente (Borba et al., 2012). Todavia a inflamação moderada a severa na citologia associada à presença de 2 cm ou mais de acúmulo de fluido intrauterino, sugerem susceptibilidade à endometrite (Burlison et al., 2010; Brinsko et al., 2003).

No período pós inseminação, o fluido intrauterino está relacionado à baixa fertilidade e associado com endometrite persistente pós cobertura (Vanderwall et al., 2003). As éguas susceptíveis são, em muitos casos, incapazes de promover o clearance uterino (Von Reitzenstein et al., 2002) e podem apresentar fluido intrauterino até mesmo antes da inseminação (Pycock et al., 1997). Esse fluido pode ser originado do endométrio devido ao aumento do edema e das secreções das glândulas (Reilas et al., 1997).

#### 2.1.4.2. Citologia

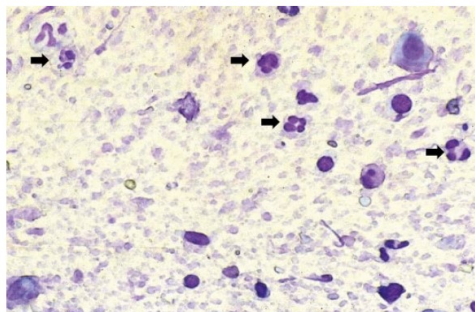
A citologia uterina é uma técnica rápida e de baixo custo que auxilia no diagnóstico da inflamação endometrial. A técnica de colheita é de suma importância pois deve fornecer um alto número de células íntegras provenientes de uma grande área do lúmen uterino. Algumas técnicas são descritas para auxiliar na amostragem: lavado de baixo volume, swab uterino, escova cervical citológica, biópsia e a recuperação de fluido intrauterino utilizando pipeta de inseminação (Canisso et al., 2016). Segundo Ferris (2016) uma nova amostra citológica deve ser coletada quando apresenta celularidade inadequada, ou seja, pouco número de células epiteliais uterinas. As lâminas são avaliadas, via microscópio, em 400x. Ainda de acordo com Ferris (2016) a escova cervical é mais sensível que o swab no diagnóstico da inflamação.

Na interpretação das lâminas, as células epiteliais uterinas podem ser encontradas de várias formas: células intactas, células rompidas, células grandes, cuboides no anestro e colunar no estro. A presença de neutrófilos (PMNs) indica inflamação ativa do endométrio e a quantidade de células por campo na citologia corresponde à classificação de inflamação (número de

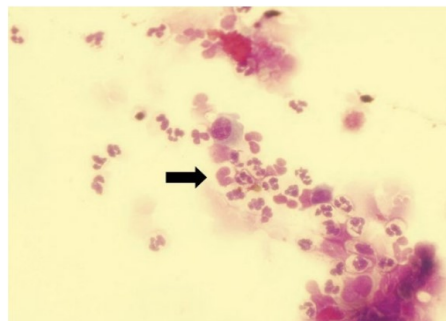
Neutrófilos/Campo), sendo normal (0-Raro), inflamação leve (1-2), inflamação moderada (3-5) e inflamação severa (>5) (Ferris et al., 2015).

Os neutrófilos são divididos em 3 a 5 segmentos ou lobos, apresentam 10 a 12 micras de diâmetro e são as células brancas predominantes. Durante avaliação citológica, outras células além dos PMNs podem ser observadas, como outros leucócitos (macrófagos, linfócitos e eosinófilos) sugestivos de cronicidade da patologia ou de condição anatomofisiológica alterada da égua (pós parto, refluxo de urina para dentro do útero, pneumovagina ou infecção fungica); debris celulares (proteínáceos, muco, células epiteliais uterinas degeneradas, células de origem não uterinas e cristais do corante) podem ser classificados como nenhum/mínimo (<25% da lamina), leve (25%-50%), ou moderado/severo (>75%), sendo a última classificação associada a endometrite bacteriana (Canisso et al., 2016; Ferris, 2016, Card, 2005); hemácias por técnica de colheita agressiva ou irritação do endométrio à presença de patógenos ou infusão de compostos; espermatozoides e/ou microorganismos (bactérias, fungos e leveduras) que podem ser confirmados na objetiva de 1000x com óleo de imersão.

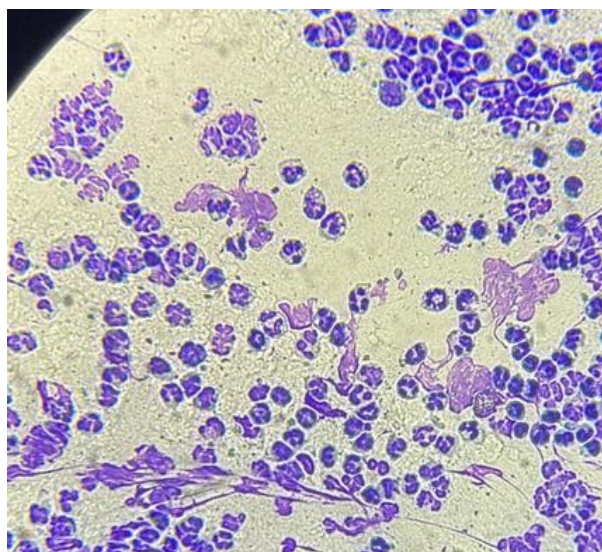
Os macrófagos apresentam citoplasma de coloração azulada com vacúolos de tamanhos variados e 20 micras de diâmetro; já os linfócitos, de formato arredondado a oval, com aproximadamente 7 micras de diâmetro, apresentam pouco citoplasma. Com 12 a 15 micras de diâmetros, os eosinófilos têm citoplasma de coloração azul com múltiplos grânulos que variam do rosa ao vermelho. Geralmente as hemácias são encontradas em baixo número, porém nas irritações endometriais podem ser achadas em grandes números, com apenas 6 micras de diâmetro e apresentam o centro mais claro. Com 3 a 5 micras de largura e 8 micras de comprimento, as hifas de fungos estão geralmente ligadas em cadeias longas e ramificadas com as leveduras, essas últimas apresentam 5 a 8 micras de tamanho e uma parede celular de 100 a 200 nm (Ferris, 2017).



**Figura 1.** Citologia endometrial positiva apresentando neutrófilos (setas) e células endometriais. Diff-Quik, 1000x. (Fonte: Ramírez-Agámez et al. 2020).



**Figura 2.** Neutrófilos e macrófago (seta) presentes em citologia uterina de égua com endometrite crônica. Diff-Quik, 200x. (Fonte: Ramírez-Agámez et al. 2020)



**Figura 3.** Infiltrado leucocitário (neutrófilos) em citologia uterina de égua com endometrite. Diff-Quik, 400x. (Fonte: Arquivo pessoal)

#### 2.1.4.3. Cultura

O crescimento de microorganismos no útero está associado a redução das taxas de prenhez e a cultura microbiológica fornece informações nos casos de endometrite infecciosa (Canisso et al., 2016). Dessa forma, a avaliação microbiológica é imprescindível para identificar e diagnosticar endometrite.

Após incubação em agar sangue durante 24 a 72 horas, os microorganismos são diagnosticados com base na hemólise, pigmentação, tamanho e morfologia da colônia, além de outros ágars e teste de coloração de gram (Ricketts et al., 2016; Beehan et al., 2009).

A janela de tempo para intervenção direta pode trazer frustração pelo tempo de crescimento que o microrganismo requer, envio para o laboratório e espera do resultado. A maioria dos diagnósticos positivos são de crescimento bacteriano, somente 1 a 5% dos swabs uterinos são de crescimento de origem fúngica (Ferris, 2017).

De acordo com Ferris (2016), o swab apresenta maior sensibilidade que a escova citológica para identificar patógenos. Um fator limitante para as colheitas com swab é que a amostra representa uma porcentagem muito pequena da superfície do lúmen uterino.

Com muita frequência, o tratamento com antibióticos é selecionado de acordo com a experiência do veterinário, que termina por não realizar o teste de sensibilidade que permite tratamento apropriado (Díaz-Bertrana et al., 2021). O correto diagnóstico da endometrite, identificação e eliminação da infecção através de um tratamento eficiente é crucial para resolver problemas crônicos, reduzir a disseminação de patógenos e melhorar os índices reprodutivos (Nocera et al., 2021).

#### 2.1.4.4. Biópsia

A colheita pode ser realizada com uma pinça de biópsia protegida com camisa sanitária ou não e introduzida através da vagina e cérvix, com auxílio ou não de espéculo vaginal, no intuito de reduzir os riscos de contaminação (Rasmussen et al., 2015; Nielsen, 2005). As amostras são fixadas em formalina 10%, embebidas em parafina e seccionadas antes de sofrerem processo de desparafinização, em seguida reidratadas e coradas com hematoxilina e eosina (Kenney, 1978).

As amostras histológicas ajudam a identificar endometrite aguda ou crônica, que podem não ter sido detectadas e/ou diagnosticadas por outros métodos (Kenney, 1978). Os PMNs podem ser encontrados no stratum

spongiosum, epitélio luminal e, principalmente, no stratum compactum (Kozdrowski et al., 2015); e a infiltração de PMNs pode ser avaliada em: nenhum, leve, moderada e forte. Esse score prediz a habilidade da égua em levar um potro a termo, sendo classificada em 4 categorias de acordo com a infiltração de células inflamatórias e alterações degenerativas agudas e crônicas que acontecem no endométrio (Kenney et al., 1986).

Nielsen et al. (2012) avaliaram que a taxa de prenhez aos 70 dias foi de 87% para as éguas com histologia negativa e de 50% para as que apresentaram histologia positiva, além de apresentarem 6,5 vezes menos chances de ficarem prenhes quando da detecção de PMNs comparado com a ausência de PMNs.

#### **2.1.5. Tratamentos**

Defeitos na conformação perineal e coaptação vulvar e lacerações do períneo são anormalidades comuns que devem ser corrigidas, de forma cirúrgica, antes da inseminação artificial ou cobertura natural. A maioria das éguas que apresentam lacerações cervicais da porção vaginal não precisam de correção cirúrgica para engravidarem, ao passo que nas lacerações cervicais da porção cranial, a cirurgia não é possível (Canisso et al., 2016).

Lavado uterino, drogas ecbólicas, antibióticos e anti-inflamatório esteroidal são utilizados nas terapias tradicionais, com o intuito de reduzir a resposta inflamatória após inseminação (Christoffersen et al., 2012; Fioratti et al., 2012).

Os lavados uterinos com solução fisiológica 0,9% e, principalmente, com solução de ringer com lactato são amplamente utilizados no intuito de remover, do útero: produtos inflamatórios, células espermáticas, microorganismos e debris. Esse procedimento pode ser realizado com a utilização de um cateter tipo bivona, estéril e introduzido através da cérvix (Brinsko et al., 1991; Canisso et al., 2016).

Os lavados pré-inseminação são indicados para éguas que apresentam acúmulo de fluido intrauterino antes mesmo da inseminação. Já os lavados pós

inseminação não afetam a fertilidade e previnem a resposta inflamatória uterina exacerbada e prolongada, principalmente quando realizados 6 horas a partir da inseminação, que corresponde ao período crítico da inflamação uterina (Scott, 2000; Woodward et al., 2013).

Agentes ecbólicos são drogas que auxiliam na eliminação de acúmulo de fluido intrauterino pela cérvix e por drenagem linfática, através da estimulação da contratilidade uterina. A prostaglandina F2alpha induz contrações brandas e prolongadas (acima de 2 horas), enquanto que a ocitocina promove fortes contrações uterinas por um período mais curto, de até 45 minutos (Troedsson et al., 1995; Troedsson et al., 2001).

O cloprostenol é um análogo de prostaglandina F2alpha usado na dose de 125-250mcg/IM, mas deve ser evitado em éguas que apresentam folículos hemorrágicos e no período após ovulação, uma vez que pode prejudicar a secreção de progesterona e formação do CL (Canisso et al., 2016; Cuervo-Arango et al., 2010).

A ocitocina pode ser utilizada nos períodos pré e pós inseminação, em intervalos que variam de 2 a 8 horas. Baixas doses de ocitocina, de 10-20 UI (Unidades Internacionais), tem se mostrado mais eficazes que doses maiores de 40 UI. Altas doses podem induzir tetania uterina e prejudicar a eliminação de acúmulo de fluidos no útero. A carbetocina é um análogo da ocitocina, porém mais potente e mais efetivo devido à sua longa ação (Stecker et al., 2012; Troedsson et al., 1995).

Os antimicrobianos são utilizados como prevenção das endometrites pós coberturas e, principalmente, como tratamento de endometrites infecciosas. As infusões intrauterinas com antibióticos podem predispor às infecções fúngicas e até mesmo por outras infecções de bactérias oportunistas, devido ao desbalanço da flora natural da vagina. A presença de bactérias ancoradas nas camadas mais profundas do endométrio e dos biofilmes impedem a ação e eficiência dos antibióticos locais. Todavia a terapia antimicrobiana sistêmica é preferível desde que o antibiótico tenha boa penetração tecidual e sua concentração chegue em altos níveis no endométrio

e lumen uterino (Canisso et al., 2015; Ferris et al., 2016; Lindholm et al., 2013; Petersen et al., 2015; Troedsson et al., 2018).

A tabela a seguir mostra os antibióticos mais comumente utilizados no tratamento de éguas afetadas por endometrite bacteriana.

**Tabela 1.** Antimicrobianos utilizados comumente no tratamento de éguas com endometrite bacteriana. Adaptado de Canisso, Segabinazzi & Fedorka (2020). PBPs: proteínas de ligação à penicilina; PABA: ácido para-aminobenzóico.

Classe Farmacológica	Terapêutica	Mecanismo Ação
Aminoglicosídeos (Ex. Sulfato de Amicacina, Sulfato de Gentamicina e Neomicina)	Bactericida, concentração dependente, amplo espectro, Gram -	Inibição irreversível da síntese de proteína bacteriana pela ligação com a subunidade 30S do ribossomo bacteriano
Cefalosporinas ( $\beta$ -Lactâmicos, 3ª geração) (Ex. Ceftiofur)	Bactericida, tempo dependente, amplo espectro, Gram - e Gram +	Inibição da síntese de parede celular por ruptura da camada de peptídeoglicanos
Fluoroquinolonas (Ex. Enrofloxacina e Ciprofloxacina)	Bactericida, concentração dependente, amplo espectro, Gram - e algumas Gram +	
Penicilinas de amplo espectro (Ex. Ampicilina e Ticarcilina)	Bactericida, tempo dependente, amplo espectro, Gram - e algumas Gram +	Interferência na síntese de membrana celular bacteriana pela inibição de transpeptidases e enzimas de peptídeoglicanos.
Penicilinas (Ex. Penicilina K, Penicilina Na e Procaina G)	Bactericida, tempo dependente, amplo espectro, Gram +	Lise de células enfraquecidas pela perda da camada de peptídeoglicanos na membrana através da ligação de PBP's externamente à parede bacteriana.
Polimixina B	Bactericida, concentração dependente, amplo espectro, Gram - (ex. <i>Pseudomonas</i> spp)	Desorganização da membrana por ligação do PBP's fora da parede bacteriana.
Sulfonamidas (Ex.	Bacteriostático, tempo dependente, amplo	Interferências na biosíntese do ácido fólico pela competição com PABA

Classe Farmacológica	Terapêutica	Mecanismo Ação
sulfametoxazol trimetoprima)	espectro, Gram - e Gram + (ex. <i>Streptococcus</i> spp)	pela dihidropteroato sintase.
Metronidazol	Concentração dependente, Gram + anaeróbios	

Também têm sido avaliados os efeitos imunomoduladores dos corticosteroides dexametasona (Bucca et al., 2008) e do acetato 9- $\alpha$ -prednisolona (Dell'Aqua et al., 2004) com a resolução da inflamação uterina e a melhora da taxa de prenhez em éguas susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura (Christoffersen et al., 2012). O tratamento com drogas anti-inflamatórias não esteroidais também tem sido usada para modular os efeitos da inflamação (Rojer et al., 2010) e aumentar as taxas de prenhez (Troedsson et al., 2018).

Algumas terapias não tradicionais têm mostrado eficiência na diminuição da resposta inflamatória uterina após inseminação e no aumento da fertilidade, como o plasma rico em plaquetas e células mesenquimais (Segabinazzi et al., 2017; Metcalf, 2014).

## 2.2. Pentoxifilina

A pentoxifilina é uma methylxanthine sintética que possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios e tem sido utilizada no tratamento que enfermidades relacionadas à circulação e fluxo sanguíneo. O efeito anti-inflamatório diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (Pollice et al., 2001). Samardzic et al. (2001) e Otani et al. (2008) também observaram a atenuação da IL-12, TNF $\alpha$ , síntese de IFN $\gamma$ , além da inibição das células T e dos efeitos citotóxicos causados pelas células naturais killer (NK). Já o efeito antioxidante ocorre pela supressão da ativação de neutrófilos que geram radicais superóxidos via NADPH oxidase (Prasad et al., 2007).

A pentoxifilina apresenta efeito hemorreológico, atua na fosforilação e ligação cruzada de proteínas na membrana plasmática dos eritrócitos

aumentando sua maleabilidade (Ward et al., 1987). Também é potente vasodilatador com efeito miorreaxante importante na função cardíaca, anti-carcinogênico, antiapoptótico e induz aumento na síntese de prostaglandinas (Collingridge et al., 2000; Meru et al., 2006).

Os efeitos imunológicos observados por Deree (2008), Perelló et al. (2017), Pozor et al. (2011) e Ward et al. (1987), são: estímulo da transcrição de citocinas anti-inflamatórias e inibição de citocinas pró-inflamatórias; redução na produção de espécies reativas de oxigênio; redução na ação de enzimas proteolíticas produzidas por granulócitos e macrófagos; prevenção da produção de fator de necrose tumoral pela inibição de fagocitose, e leucotrienos por ação da ativação da proteína Kinase A (PKA) resultante da ação inibitória não seletiva da enzima fosfodiesterase, que leva a hidrólise dos nucleotídeos cíclicos e por consequência aumento dos níveis de AMP cíclico intracelular. O efeito final observado é redução da resposta inflamatória (Pozor, 2011).

O uso da pentoxifilina promove o aumento do remodelamento das hemácias permitindo aumento na circulação e vascularização de diversos tecidos no organismo, como placenta e cascos (Brinsko et al., 2011). Também foram observados diminuição da viscosidade plasmática, redução dos níveis de fibrinogênio no plasma, redução dos riscos de ruptura e agregação plaquetária, aumento da flexibilidade e/ou distensibilidade dos eritrócitos diminuindo sua agregação (Soria et al., 1990). Também foi relatado aumento do fluxo sanguíneo capilar e consequentemente melhor eficiência da fluidez de neutrófilos pelos microvasos (Ott et al., 1983).

O aumento do fluxo sanguíneo ao tecido comprometido foi relatado por Pozor et al. (2011), onde garanhões tratados com pentoxifilina, via oral, tiveram melhora na microcirculação testicular.

Tsunoda et al. (2015), observaram aumento da motilidade espermática bem como das características da cinética espermática, revelando a pentoxifilina como potente estimulador da motilidade. O aumento da motilidade progressiva espermática foi avaliado no sêmen descongelado após adição de pentoxifilina (Marques et al., 2002). Goulart et al. (2004) notou a redução dos efeitos deletérios causados pelos radicais livres de oxigênio sobre a célula

espermática, preservando sua capacidade fertilizante. Auxiliando também em procedimentos de fertilização in vitro, inibindo a enzima fosfodiesterase (Yovich, 1993), levando, por consequência, um incremento dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico nas células (Barton, 1995).

O tratamento com pentoxifilina oral e outros fármacos foi eficiente em éguas com placentite induzidas, sendo capaz de prolongar a gestação e a viabilidade neonatal. Esses dados sugerem que a pentoxifilina combinada aos outros fármacos possam reduzir os efeitos da inflamação e da infecção na placentite (Bailey et al., 2010). Possivelmente por causar desregulação de citocinas pró-inflamatórias (Lauterbach, 1996; Lauterbach, 2004). As propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladora possuem efeito dose-dependente na redução dos mediadores inflamatórios (IL-1 e TNFalpha) (Card et al., 1995; Palmer et al., 2002).

Macpherson (2006), afirmou que a pentoxifilina apresenta boa penetração uterina, onde foi detectada nas membranas fetais (fluido alantoide e feto). Essas concentrações terapêuticas podem ser encontradas a partir de 4 horas da sua administração (Hendry et al., 2002). Graczyk et al. (2006) também detectou a droga nos tecidos placentários analisados, porém esse modelo observado não melhorou a viabilidade fetal, apesar das éguas tratadas terem levado a gestação por um período maior do que as éguas não tratadas.

Essa droga foi eficiente na diminuição da pressão vascular pulmonar durante o exercício, reduzindo ruptura dos capilares pulmonares. Prevenindo, desta forma, a hemorragia pulmonar induzida por exercício ou diminuindo sua gravidade (Semeco et al., 2006).

A pentoxifilina também possui outras aplicabilidades tais como: tratamento de endotoxemia equina, laminite e doença do navicular (Crisman et al., 1993). Nos casos de laminite equina houve incremento da perfusão sanguínea nos cascos (Leal et al., 2020). Eficaz nas claudicações em humanos com melhora da microcirculação (Jacoby et al., 2004; Lee et al., 2001) e como inibidor da agregação plaquetária (Kornreich et al., 2010).

Pentoxifilina pode diminuir a colonização de bactérias facilitando o “clearance” bacteriano e reduzir os danos no tecido causado pela infiltração neutrofílica (Baumgartner, 2007).

### **2.3. Nutracêuticos**

O fator nutricional é de suma importância para a manutenção da atividade reprodutiva da égua, no entanto quando inadequado pode levar ao declínio da função reprodutiva (Ignácio et al., 2021; Schillo, 1992).

Os principais componentes de nutracêuticos para fins reprodutivos e suas funções:

O ácido fólico, vitamina B9, está envolvido na síntese de DNA. A sua deficiência está associada a morte embrionária e aborto (Gomes et al., 2014), além de contribuir para o aumento de espécies reativas de oxigênio, anormalidades cromossômicas e mutações genéticas (Freitas et al., 2016).

Os ácidos graxos são responsáveis por manter a integridade e a função da membrana plasmática. O Ácido Linoleico e ácido Linolenico são DPA (docosapentaenoic acid) fatty acid ômega 6 and DHA (docosahexaenoic acid) fatty acid ômega 3 respectivamente (Colenbrander et al., 1992). O equilíbrio entre os lipídios e os antioxidantes reduz os danos celulares causados pela ação dos radicais livres (Freitas et al., 2018; Gliozzi et al., 2009). O aumento na proporção do DPA está associado com a redução da fertilidade, enquanto o aumento do DHA condiz com o aumento da fertilidade (Aitken, 1994).

A arginina funciona como mensageiro intracelular para: neurotransmissão, ativação de células do sistema imunológico, expressão de genes, diferenciação celular, síntese de hormônios e tônus vascular (Freitas et al., 2018). O estímulo à liberação de GnRH acontece devido a ação do óxido nítrico, no hipotálamo, produzido pelo aminoácido arginina. Responsável pela metabolização do óxido nítrico, sugerindo ainda melhora na fertilidade pela redução do acúmulo de fluido intrauterino (Kelley et al., 2011).

O B-Caroteno está associado ao aumento da eficiência reprodutiva (Van Der Holst, 1984), a melhora da qualidade endometrial, do fluido folicular e das células da granulosa (Chew et al., 1994). A vitamina A tem função

antioxidante (Santos et al., 1996) e atua na conservação das mucosas do trato genito urinário e auxilia na produção dos hormônios esteroides nas gônadas, glândula adrenal e placenta. Possui relação ao desenvolvimento embrionário adequado (Gomes et al., 2014). Sua deficiência pode causar atrofia das glândulas reprodutivas (Freitas et al., 2018).

Os componentes selênio, cobre e zinco são essenciais para estimular a defesa antioxidante no sistema reprodutivo (Freitas et al., 2018). Estimulam a atividade das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase, aumentando o catabolismo e reduzindo as enzimas oxidativas (Brown et al., 2001; Kirschvink et al., 2008).

A L-carnitina está envolvida na proteção antioxidante contra as EROS e no metabolismo energético celular (Freitas et al., 2018). Sendo capaz de gerar energia a partir do transporte de ácidos graxos através da membrana mitocondrial e auxiliar na beta oxidação (Zeyner et al., 1999).

A vitamina B12 tem função de estimular a síntese, crescimento e maturação celular, essencial na replicação gênica e na manutenção da estabilidade da cromatina. Na deficiência dessa vitamina há um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido a interrupção no metabolismo mitocondrial (Al-Maskari et al., 2012).

Outro potente antioxidante é a vitamina E, que minimiza as injúrias causadas por ROS e previne a peroxidação lipídica (Finno et al., 2012). Além de proteger outras vitaminas lipossolúveis (Andrighetto et al., 2002) e melhorar a função neutrofílica (Politis et al., 1995). Na sua deficiência há uma depleção dos linfócitos T e B (Pekmezci, 2011).

A dieta de melhor qualidade com níveis proteicos adequados influenciou positivamente com aumento do tamanho de folículos pré-ovulatórios (Niekerk et al., 1997) e dos níveis de progesterona circulante (Hunt, 1983). Enquanto que nas éguas não suplementadas houve atraso no início da ciclicidade e maior incidência de atresia folicular (Niekerk et al., 1997). O acesso a uma alimentação adequada é essencial, principalmente no que se refere a micronutrientes. O uso de nutracêuticos garante essas necessidades (Smith et al., 2000).

A sinergia dos componentes da dieta suplementar exerce efeito sistêmico e multifatorial. Suplementos contendo vitaminas, minerais, antioxidantes e nutrientes de suporte metabólico celular tem potencial para alterar resultados reprodutivos (Catandi et al., 2022). Alguns trabalhos demonstraram aumento do poder antioxidante no plasma seminal, com consequente melhora na qualidade do sêmen de garanhões além de efeitos benéficos sobre a espermatogênese e maturação de espermatozoides no epidídimo (Contri et al., 2011) e diminuição das anormalidades morfológicas espermáticas (Deichsel et al., 2008). A suplementação também atenuou a queda dos parâmetros integridade de membrana e motilidade de sêmen refrigerado durante o inverno (Lausigk et al., 2014).

Os oócitos de éguas velhas são expostos a altas concentrações de EROS (espécies reativas de oxigênio) por longos períodos ocasionando falhas no metabolismo oxidativo mitocondrial, desregulação da meiose e mutações de mtDNA, favorecendo doenças metabólicas e infertilidade (Catandi et al., 2022). Porém com a suplementação houve uma diminuição do estresse oxidativo pela redução na produção de espécies reativas de oxigênio pelas células da granulosa permitindo melhor desenvolvimento e maturação do oócito, com mudanças no metabolismo e composição lipídica (Catandi et al., 2022; Devine et al., 2012; Zarezadeh et al., 2018). El-Shahat et al. (2010), observaram melhora no tamanho de folículos pré-ovulatórios e taxas de ovulação em ovelhas suplementadas com ácidos graxos de cadeia longa e L-carnitina.

### **3. CONCLUSÃO**

A neutrofilia persistente, o aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias, diminuição das citocinas anti-inflamatórias, acúmulo de fluido intra-uterino são reflexos de uma resposta inflamatória intensa e prolongada observada após inseminação em éguas susceptíveis a endometrite, somados à defesa imunológica e atividade miometrial deficientes. Os métodos de diagnóstico são complementares entre si e cruciais na identificação do grau da inflamação e na decisão do melhor tratamento. A suplementação com nutracêutico aumenta o suporte metabólico celular e o efeito antioxidante, com consequente redução do estresse oxidativo. A pentoxifilina também apresenta

ação antioxidante com redução da produção de espécies reativas de oxigênio além de aumentar a transcrição de citocinas anti-inflamatórias e inibir a transcrição de citocinas pró-inflamatória.

#### 4. REFERÊNCIAS

Aitken R. A free radical theory of male infertility. *Reproduction, Fertility and Development*. 1994;6(1):19-24.

Al-Maskari MY, Waly MI, Ali A, Al-Shuaibi YS, Ouhtit A. Folate and vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia promote oxidative stress in adult type 2 diabetes. *Nutrition*. 2012 Jul;28(7-8):e23–6.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology*. 2004 Feb 1;5(3):266–71.

Andriguetto JM, Perly L, Minardi I, Gemael A, Flemming JS, Souza GA, Filho AB. As vitaminas na produção animal. In: *Nutrição animal*. São Paulo: Nobel; 2002;1:135-64.

Anwar H, Strap JL, Costerton JW. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992 Jul 1;36(7):1347–51.

Arend WP. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2000 Nov 1;59(90001):60i64.

Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine* [Internet]. 2000 May 1 [citado 2022 Mar 7];6(5):583–8. Disponível em: [https://www.nature.com/articles/nm0500\\_583](https://www.nature.com/articles/nm0500_583)

Bailey CS, Macpherson ML, Pozor MA, Troedsson MHT, Benson S, Giguere S, et al. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. *Theriogenology*. 2010 Aug;74(3):402–12

Bailey CS, Macpherson ML, Graczyk J, Pozor MA, Troedsson MHT, LeBlanc MM, et al. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline, and altrenogest in equine placentitis. *Theriogenology*. 2007 Aug; 53:339-40.

Barton MH. Treatment of equine endotoxemia. *Proc. Am. Assoc. Equine. Pract.* 1995;41:112-6.

Baskett A, Barton MH, Norton N, Anders B, Moore JN. Effect of pentoxifylline, flunixin meglumine, and their combination on a model of endotoxemia in horses. *Am J Vet Res*. 1997; 58:1291–9.

Baumgartner T. Pentoxifylline. *J. Exotic Pet. Med*. 2007; 2:118-21.

Beehan DP, McKinnon AO. How to diagnose common equine reproductive tract bacterial pathogens using chromogenic agar. *Proc 55th Ann Conv Am Ass Equine Practitioners*. 2009.

Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. Development of horse embryos up to twenty-two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of Anatomy*. 1982; 135:191–209.

Bonizzi G, Karin M. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004; 25:280–8.

Boosman R, Nemeth F. Pathogenesis and drug therapy of acute laminitis in horses: A literature review. *Tijdschr Diergeneeskd*. 1988; 113:1237–46.

Borba EVC, Camozzato GC, Malschitzky E, Bustamante-Filho IC, Martins AA, Mattos RC, et al. Is the presence of uterine fluid a reliable indicator of endometrial inflammation? *Pferdeheilkunde Equine Medicine*. 2012;28(1):27–9

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, NY)* [Internet. 2004 [citado 2019 Mar 20];303(5663):1532–5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782>

Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. *Manual of Equine Reproduction*. 3rd ed. Maryland Heights: Elsevier; 2011.

Brinsko SP, Rigby SL, Varner DD, Blanchard TL. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *Proc 49th Ann Conv Am Ass Equine Practitioners*. 2003;363-5.

Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*. 1991; 35:1111-9.

Brown K, Arthur J. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition*. 2001 Apr;4(2b):593–9.

Bucca S, Carli A, Buckley T, Dolci G, Fogarty U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*. 2008 Oct;70(7):1093–100.

Burleson MD, Leblanc MM, Riddle WT, Hendricks. Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. *Animal Reproduction Science*. 2010 Jan;121(1-2):103.

Canisso IF, Ball BA, Cray C, Williams NM, Scoggin KE, Davolli GM, et al. Serum Amyloid A and Haptoglobin Concentrations are Increased in Plasma of Mares with Ascending Placentitis in the Absence of Changes in Peripheral Leukocyte Counts or Fibrinogen Concentration. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2014 Jun 11;72(4):376–85.

Canisso IF, Silva MAC. Bacterial endometritis. In: Sprayberry KA, Robinson NE, editors. *Robinson's current therapy in equine medicine*. St Louis (MO): WB Saunders. 2015;683-8.

Canisso IF, Segabinazzi LGTM, Fedorka CE. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares—A Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Feb 20;21(4):1432.

Canisso IF, Stewart J, Silva MAC. Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. *Vet Clin Equine*. 2016; 3:465-80.

Card C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*. 2005; 64:580-8.

Card CE, Wood MR. Effects of acute administration of clenbuterol on uterine tone and equine fetal and maternal heart rates. *Biol Reprod Monogr*. 1995; 1:7–11.

Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*. 2000; 54:965–79.

Catandi GD, LiPuma L, Obeidat YM, Maclellan LJ, Broeckling CD, Chen T, et al. Oocyte metabolic function, lipid composition, and developmental potential are altered by diet in older mares. *Reproduction*. 2022 Apr 1;163(4):183–98.

Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol*. 2004; 5:241.

Chew B, Scenzi T, Wong V, Coelho M. Uptake of B-carotene by plasma, follicular fluid, granulosa cells, endometrium in pigs injectable B-carotene. *J. Anim. Sci*. 1994;72(Supl 1):100.

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Apr 16;274(16):10689–92.

Christoffersen M, Woodward E, Bojesen AM, Jacobsen S, Petersen MR, Troedsson MH, et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Veterinary Research*. 2012;8(1):41.

Colenbrander B, Fazeli AR, Van Buiten A, Parlevliet J, Gadella BM. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1992; 88:49-58. PMID:1283655.

Collingridge DR, Rockwell S. Pentoxifylline improves the oxygenation and radiation response of BA1112 rat rhabdomyosarcomas and EMT6 mouse mammary carcinomas. *International Journal of Cancer*. 2000;90(5):256–64.

Contri A, De Amicis I, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D, et al. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*. 2011 Apr;75(7):1319–26.

Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2008 Apr 18;180(9):5771–7. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/180/9/5771>

Crisman MV, Wilcke JR, Correll LS, Irby MH. Pharmacokinetic disposition of intravenous and oral pentoxifylline in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1993 Mar;16(1):23–31.

Cronin JG, Turner ML, Goetze L, Bryant CE, Sheldon IM. Toll-Like Receptor 4 and MYD88-Dependent Signaling Mechanisms of the Innate Immune System Are Essential for the Response to Lipopolysaccharide by Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 2012 Feb 1;86(2):51.

Cuervo-Arango J, Newcombe JR. Effect of changes in endometrial edema score following mating on pregnancy rate in mare. *Anim Reprod Sci*. 2010; 121S:S115-7.

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.

Cyktor JC, Turner J. Interleukin-10 and Immunity against Prokaryotic and Eukaryotic Intracellular Pathogens. Maurelli AT, editor. *Infection and Immunity*. 2011 Aug;79(8):2964–73.

Deichsel K, Palm F, Koblichke P, Budik S, Aurich C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*. 2008 May;69(8):940–5.

Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. Insights into the regulation of TNF- $\alpha$  production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics*. 2008;63(3):321–8.

Diao H, Kohanawa M. Endogenous Interleukin-6 Plays a Crucial Protective Role in Streptococcal Toxic Shock Syndrome via Suppression of Tumor Necrosis Factor Alpha Production. *Infection and Immunity*. 2005 May 19;73(6):3745–8.

Díaz-Bertrana ML, Deleuze S, Pitti Rios L, Yeste M, Morales Fariña I, Rivera del Alamo MM. Microbial Prevalence and Antimicrobial Sensitivity in Equine Endometritis in Field Conditions. *Animals* [Internet]. 2021 May 1 [citado 2022 Apr 8];11(5):1476. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/5/1476/htm>

- Doré M, Sirois J. Regulation of P-Selectin Expression by Inflammatory Mediators in Canine Jugular Endothelial Cells. *Veterinary Pathology*. 1996 Nov;33(6):662–71.
- El-Shahat KH, Abo-El maaty AM. The effect of dietary supplementation with calcium salts of long chain fatty acids and/or l-carnitine on ovarian activity of Rahmani ewes. *Animal Reproduction Science*. 2010 Jan;117(1-2):78–82.
- Fedorka CE, Loux SL, Scoggin KE, Adams AA, Troedsson MHT, Ball BA. Alterations in T cell-related transcripts at the feto-maternal interface throughout equine gestation. *Placenta*. 2020 Jan; 89:78–87.
- Ferris RA. Bacterial endometritis: A focus on biofilms. *Clin. Theriogenol*. 2014; 6:315–19.
- Ferris RA. Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. *Rev. Bras. Reprod. Anim*. 2017; 41:74–80.
- 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, Bohn A, McCue PM. Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. *Equine Veterinary Education*. 2015 Feb 3;27(6):316–22.
- Ferris RA, McCue PM, Borlee GI, Loncar KD, Hennes 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. Fenwick BW, editor. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Mar;54(3):631–9.
- Finno CJ, Valberg SJ. A Comparative Review of Vitamin E and Associated Equine Disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2012 Aug 27;26(6):1251–66.
- Fioratti EG, Villaverde AISB, Melo CM, Tsunemi MH, Papa FO, Alvarenga MA. Influence of Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Viability and Fertility of Equine Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2012 Dec;32(12):771–5.
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological Reviews*. 2009 Jan;227(1):106–28.
- Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology*. 1991 Nov;36(5):823–30.
- Freitas ML, Bouéres CS, Pignataro TA, Gonçalves de Oliveira FJ, de Oliveira Viu MA, de Oliveira RA. Quality of Fresh, Cooled, and Frozen Semen from Stallions Supplemented with Antioxidants and Fatty Acids. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2016 Nov; 46:1–6.

Freitas ML, Oliveira RA de. Nutraceutical in male reproduction. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. 2018;40.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* [Internet]. 2007 Jan 8 [citado 2019 Feb 28];176(2):231–41. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2063942/>

Fumuso E, Giguère S, Wade J, Rogan D, Videla-Dorna I, Bowden RA. Endometrial IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2003 Nov;96(1-2):31–41.

Fumuso E, Aguilar J, Gigu S. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. *Animal Reproduction Science*. 2006 Aug;94(1-4):282–5.

Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007 Jul;118(1-2):30–9.

Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Science Translational Medicine*. 2011 Mar 9;3(73).

Gerard N, Caillaud M, Martoriati A, Goudet G, Lalmanach A. The interleukin-1 system and female reproduction. *Journal of Endocrinology*. 2004 Feb 1;180(2):203–12.

Ginther OJ, Pierson RA. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. *Theriogenology*. 1984 Mar;21(3):505–16.

Girling JE, Hedger MP. Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunology & Cell Biology*. 2007 Jun 26;85(6):481–9.

Gliozzi TM, Zaniboni L, Maldjian A, Luzi F, Maertens L, Cerolini S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology*. 2009 Apr;71(6):910–9.

Gomes GM, Ramos DDS, Jacob JCF, Crespilho AM, Cortes PP, De Macedo LP, et al. Influencia da administração do promater® sobre a produção de embriões e perfil hematológico de doadoras de embrião equino. *Revista de Saúde*. 2014 Dec 1;5(1.2):11-21.

Gores-Lindholm AR, LeBlanc MM, Causey R, Hitchborn A, Fayrer-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.

Goulart H de M, Silva AEDF, McManus C, Papa FO. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de eqüinos, após o resfriamento a 5oC. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2004 Feb;33(1):112–22.

Graczyk J, Macpherson ML, Pozor MA, Troedsson MHT, Eichelberger AC, Leblanc MM, et al. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole and pentoxifylline in equine placentitis. *Animal Reproduction Science*. 2006 Aug;94(1-4):434–5.

Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Apr 16;93(8):3308–12.

Grossman TR, Hettrick LA, Johnson RB, Hung G, Peralta R, Watt A, et al. Inhibition of the alternative complement pathway by antisense oligonucleotides targeting complement factor B improves lupus nephritis in mice. *Immunobiology*. 2016 Jun;221(6):701–8.

Hackett T-L, Holloway R, Holgate ST, Warner JA. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo study. *Respiratory Research*. 2008 May 29;9(1).

Håkansson A, Albiñ A, Magnusson U. The contribution of complement to opsonic activity in the uterine secretions of mares free of endometritis. *Theriogenology*. 1993 Mar;39(3):601–9.

Hendry JM, Lester GD, Hansen PJ, O'Donnell LJ. Patterns of uterine myoelectrical activity in reproductively normal mares in late gestation and in mares with experimentally induced ascending placentitis. *Theriogenology*. 2002 Aug;58(2-4):853–5.

Hunt LD. The effects of dietary protein on reproduction in pony mares. 1983;29 p.

IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp

Ignácio FS, Meira C. Subfertility in mares: how to diagnose the cause? *Rev Bras Reprod Anim*. 2021;45(4):533-41.

Jacoby D, Mohler ER. Drug Treatment of Intermittent Claudication. *Drugs*. 2004;64(15):1657–70.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann. Rev. Immunol*. 2002; 20:197–216.

Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *The Journal of Immunology*. 2005 Sep 7;175(6):3463–8.

Jørgensen N, Persson G, Hviid TVF. The Tolerogenic Function of Regulatory T Cells in Pregnancy and Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2019 May 8;10:911.

- Katila T. Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reproductive Biology*. 2016 Sep;16(3):189–96.
- Katila T. Onset and Duration of Uterine Inflammatory Response of Mares after Insemination with Fresh Semen. *Biology of Reproduction*. 1995 Jan 1;52(monograph\_series1):515–7.
- Kelley DE, Warren LK, Mortensen CJ. L-Arginine supplementation reduces uterine fluid accumulation post foaling in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2011 May;31(5-6):315–6.
- Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare's endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc*. 1978; 172:241-62.
- Kenney RM, Doig PA. *Equine endometrial biopsy: Current therapy in Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders. 1986;723-9.
- Kirschvink N, Moffarts B de, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*. 2008 Aug;177(2):178–91.
- Kitaya K, Yamada H. Pathophysiological Roles of Chemokines in Human Reproduction: An Overview. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010 Nov 19;65(5):449–59
- Knutti B, Pycocock JF, Weijden GC, Küpfer U. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. *Equine Veterinary Education*. 2010 Jan 5;12(5):267–70.
- Kornreich B, Enyeart M, Jesty SA, Nydam DV, Divers T. The Effects of Pentoxifylline on Equine Platelet Aggregation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2010 Aug 12;24(5):1196–202.
- Kozdrowski R, Sikora M, Buczkowska J, Nowak M, Raś A, Dzieciół M. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. *Animal Reproduction Science*. 2015 Mar;154:56–62.
- Kuchma SL, Connolly JP, O'Toole GA. A Three-Component Regulatory System Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* [Internet]. 2005 Feb 1;187(4):1441–54. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC545632/>
- Kumar V. The complement system, toll-like receptors and inflammasomes in host defense: three musketeers' one target. *International Reviews of Immunology*. 2019 May 8;38(4):131–56.
- Lauterbach R, Pawlik D, Zembala M, Szymura-Oleksiak J, Lisowska-Miszczyk I, Kowalczyk D, et al. Pentoxifylline in and prevention and treatment of chronic lung disease. *Acta Paediatrica*. 2007 Jan 2; 93:20–2.
- Lauterbach R, Zembala M. Pentoxifylline reduces plasma tumour necrosis factor-alpha concentration in premature infants with sepsis. *Eur J Pediatr* 1996;155(5):404–9.

- Lawrence T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. 2009 Oct 7;1(6):a001651–1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882124/>
- Leal L, Nogueira EWC. Tratamento conservativo de avulsão no casco de um equino- relato de caso. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*. 2020 Feb 14; 8(1).
- 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 M, Causey R. Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009 Sep; 44:10–22.
- LeBlanc MM, Neuwirth L, Asbury AC, Trant T, Mauragis D, Klapstein E. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Veterinary Journal*. 1994 Mar;26(2):109–13.
- Lee T. Differential lipogenic effects of cilostazol and pentoxifylline in patients with intermittent claudication: potential role for interleukin-6. *Atherosclerosis*. 2001 Oct;158(2):471–6.
- Liu I, Rakestraw P, Coit C, Harmon F, Snyder J. An in vitro investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility. *Pferdeheilkunde*. 1997; 13:557.
- Lögters T, Margraf S, Altrichter J, Cinatl J, Mitzner S, Windolf J, et al. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Medical Microbiology and Immunology*. 2009 Aug 4;198(4):211–9.
- Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, Wozniak DJ. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. *Journal of Bacteriology*. 2006 Sep 15;188(23):8213–21.
- Macpherson ML. Diagnosis and Treatment of Equine Placentitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2006 Dec;22(3):763–76.
- Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9:34–9.
- Marques A, Arruda RP, Celeghini ECC, Gobesso AAO, Neto JRN. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology*. 2002 Aug;58(2-4):257–60.
- Marth CD, Firestone SM, Hanlon D, Glenton LY, Browning GF, Young ND, et al. Innate immune genes in persistent mating-induced endometritis in horses. *Reproduction, Fertility and Development*. 2018;30(3):533.
- Martoriati A, Duchamp G, Gérard N. In Vivo Effect of Epidermal Growth Factor, Interleukin-1 $\beta$ , and Interleukin-1RA on Equine Preovulatory Follicles1. *Biology of Reproduction*. 2003 May 1;68(5):1748–54.

Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Seminars in Immunology*. 1998 Oct;10(5):351–3.

Meri S. Self-nonsel self discrimination by the complement system. *FEBS Letters*. 2016 Jul 19;590(15):2418–34.

Merighi M, Lee VT, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. 2007 Aug;65(4):876–95.

Meru VA, Mittra S, Thyagarajan B, Chugh A. Intermittent claudication: Na overview. *Atherosclerosis*. 2006;187(2):221-37.

Mesa AM, Warren LK, Sheehan JM, Kelley DE, Mortensen CJ. l-Arginine supplementation 0.5% of diet during the last 90 days of gestation and 14 days postpartum reduced uterine fluid accumulation in the broodmare. *Animal Reproduction Science*. 2015 Aug; 159:46–51.

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.

Mitchell G, Liu IK, Perryman LE, Stabenfeldt GH, Hughes JP. Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium—A mucosal immune system. *J. Reprod. Fertil. Suppl*. 1982; 32:161–8.

Moldenhauer LM, Diener KR, Thring DM, Brown MP, Hayball JD, Robertson SA. Cross-Presentation of Male Seminal Fluid Antigens Elicits T Cell Activation to Initiate the Female Immune Response to Pregnancy. *The Journal of Immunology*. 2009 Jun 3;182(12):8080–93.

Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *The American Journal of Surgery* [Internet]. 2004 May;187(5): S65–70. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002961003003064>

Nash DM, Sheldon IM, Herath S, Lane EA. Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Animal Reproduction Science*. 2010 May;119(1-2):31–9.

Nielsen JM. Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*. 2005 Aug;64(3):510–8.

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.

Nocera FP, Ambrosio M, Conte A, Palma TD, Castaldo S, Pasolini MP, Fiorito F, Martino LD. Importance of broth-enrichment culture in equine endometritis diagnosis. *New Microbiologica*. 2021;44(1):19-23.

Nonaka M. Evolution of the complement system. *Subcell. Biochem.* 2014; 80:31–43.

Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 117:1162–72.

Otani S, Kuinose M, Murakami T, Saito S, Iwagaki H, Tanaka N, et al. Preoperative oral administration of pentoxifylline ameliorates respiratory index after cardiopulmonary bypass through decreased production of IL-6. *Acta Med Okayama* 2008 Apr;62(2):69–74.

Ott E, Lechner H, Fazekas F. Hemorheological Effects of Pentoxifylline on Disturbed Flow Behavior of Blood in Patients with Cerebrovascular Insufficiency. *European Neurology.* 1983;22(1):105–7.

Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology.* 2011 Apr;75(7):1311–8.

Palm F, Walter I, Budik S, Kolodziejek J, Nowotny N, Aurich C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology.* 2008 Sep;70(5):843–51.

Palmer E, Chavette-Palmer P, Duchamp G, Levy L. Lack of effect of clenbuterol for delaying parturition in late pregnant mares. *Theriogenology.* 2002 Aug;58(2-4):797–9

Parham P. *The Immune System.* 4th Edition. New York: Garland Science. 2015

Pekmezci D. Vitamin E and immunity. *Vitam Horm.* 2011; 86:179-215.

Perelló M, González-Foruria I, Castillo P, Martínez-Florensa M, Lozano F, Balasch J, et al. Oral Administration of Pentoxifylline Reduces Endometriosis-Like Lesions in a Nude Mouse Model. *Reproductive Sciences.* 2016 Oct 12;24(6):911–8.

Petersen MR, Skive B, Christoffersen M, Lu K, Nielsen JM, Troedsson MHT, et al. Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in mares with subclinical endometritis. *Veterinary Microbiology.* 2015 Aug;179(1-2):119–25.

Politis I, Hidioglou M, Batra TR, Gilmore JA, Gorewit RC, Scherf H. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *Am J Vet Res.* 1995 Feb;56(2):179-84.

Pollice PF, Rosier RN, Looney RJ, Puzas JE, Schwarz EM, O'Keefe RJ. Oral Pentoxifylline Inhibits Release of Tumor Necrosis Factor-Alpha from Human Peripheral Blood Monocytes. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume.* 2001 Jul;83(7):1057–61.

Pozor MA, Muehlhaus J, King A, Macpherson ML, Troedsson MH, Bailey CS. Effect of pentoxifylline treatment on testicular perfusion and semen quality in Miniature horse stallions. *Theriogenology.* 2011 Oct;76(6):1027–35.

Prasad K, Lee P. Suppression of hypercholesterolemic atherosclerosis by pentoxifylline and its mechanism. *Atherosclerosis*. 2007 Jun;192(2):313–22.

Pycock JF, Allen WE. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Veterinary Journal*. 1990 Nov;22(6):422–5.

Pycock JF, Paccamonti D, Jonker H, Newcombe J, van der Weijden G, Taverne M. Can mares be classified as resistant or susceptible to recurrent endometritis. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*. 1997;13(5):431–6.

Ramírez-Agámez L, Hernández-Avilés C, Makloski-Cohorn C. Cytology of the Endometrium. In: Wiley Blackwell. *Equine Hematology, Cytology, and Clinical Chemistry*. 2020 Nov;243-255.

Rasmussen CD, Petersen MR, Bojesen AM, Pedersen HG, Lehn-Jensen H, Christoffersen M. Equine Infectious Endometritis—Clinical and Subclinical Cases. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2015 Feb;35(2):95–104.

Rebello SA, Macpherson ML, Murchie TA, et al. The detection of placental drug transfer in equine allantoic fluid. *Theriogenology* 2005;64(3):776–7.

Rebello SA, Macpherson ML, Murchie TA, Leblanc MM, Vickroy TW. Placental transfer of trimethoprim sulfamethoxazole and pentoxifylline in pony mares. *Animal Reproduction Science*. 2006 Aug;94(1-4):432–3.

Rebordão MR, Carneiro C, Alexandre-Pires G, Brito P, Pereira C, Nunes T, et al. Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of Reproductive Immunology*. 2014 Dec; 106:41–9.

Reilas T, Katila T, Mäkelä O, Huhtinen M, Koskinen E. Intrauterine Fluid Accumulation in Oestrous Mares. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1997 Mar;38(1):69–78.

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.

Ricketts SW, Mackintosh ME. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *J Reprod Fertil Suppl*. 1987;(35):343-51.

Robertson SA, Chin P-Y, Femia JG, Brown HM. Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming. *Journal of Reproductive Immunology*. 2018 Feb; 125:80–8.

Rus H, Cudrici C, Niculescu F. The Role of the Complement System in Innate Immunity. *Immunologic Research*. 2005;33(2):103–12.

Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T Cells in Immunologic Self-Tolerance and Autoimmune Disease. *International Reviews of Immunology*. 2005 Jan;24(3-4):211–26.

Samardzic T, Jankovic V, Stosic-Grujicic S, Popadic D, Trajkovic V. Pentoxifylline inhibits the synthesis and IFN- $\gamma$ -inducing activity of IL-18. *Clinical and Experimental Immunology*. 2001 May;124(2):274–81.

Santos MS, Meydani SN, Leka L, Wu D, Fotouhi N, Meydani M, et al. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *The American Journal of Clinical Nutrition* [Internet]. 1996 Nov 1 [citado 2020 Jun 28];64(5):772–7. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/64/5/772/4655325>

Schillo KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *Journal of Animal Science*. 1992 Apr 1;70(4):1271–82.

Schjenken JE, Robertson SA. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: Implications for reproductive outcome and offspring health. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015; 868:127-58.

Schmid-Lausigk Y, Aurich C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. *Theriogenology* [Internet]. 2014 Apr 15;81(7):966–73. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X1400054>

Scott MA, Liu IKM, Overstreet JW. Sperm transport to the oviducts: Abnormalities and their clinical implications. *Proc Am Assoc Equine Pratt.* 1995; 41:1-2.

Scott MA. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science*. 2000 Jul;60-61:337–48.

Segabinazzi LGTM, Canisso IF, Podico G, Cunha LL, Novello G, Rosser MF, et al. Intrauterine Blood Plasma Platelet-Therapy Mitigates Persistent Breeding-Induced Endometritis, Reduces Uterine Infections, and Improves Embryo Recovery in Mares. *Antibiotics*. 2021 Apr 23;10(5):490.

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.

Semeco E, Falcon J, Pivat IV, Fernández M, Rodriguez M, Basalo A, et al. Efficacy of pentoxifylline in the treatment of Exercise-Induced pulmonary hemorrhage in Thoroughbred racehorses. *Revista Científica de Veterinaria*. 2006 Sep;16(5):481-91.

Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. A distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiology*. 2006;6(1):53.

Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth H-J. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 2009 Dec 1;81(6):1025–32.

- Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology*. 2002 Jun;2(6):389–400.
- Smith OB, Akinbamijo OO. Micronutrients and reproduction in farm animals. *Animal Reproduction Science*. 2000 Jul;60-61:549–60.
- Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*. 2004 May;112(1):38–43.
- Soria J, Giovannangeli ML, Jolchine IE, Chassoux G. Pentoxifylline, fibrinogen and leukocytes. *Blood Coagulation Fibrinolysis*. 1990 Oct;1(4–5):485–7.
- Souza-Fonseca-Guimaraes F, Adib-Conquy M, Cavaillon J-M. Natural Killer (NK) Cells in Antibacterial Innate Immunity: Angels or Devils? *Molecular Medicine*. 2011 Nov 10;18(2):270–85.
- Steckler D, Naidoo V, Gerber D, Kähn W. Ex vivo influence of carbetocin on equine myometrial muscles and comparison with oxytocin. *Theriogenology*. 2012 Aug;78(3):502–9.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 2004 Feb;16(1):3–9.
- Thomas PGA, Ball BA, Brinsko SP. Interaction of Equine Spermatozoa with Oviduct Epithelial Cell Explants is Affected by Estrous Cycle and Anatomic Origin of Explant<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 1994 Aug 1;51(2):222–8.
- Tizard IR. Innate immunity: The recognition of invaders. In *Veterinary Immunology*. 9th ed. St. Louis: Elsevier Saunders. 2009; 1:11–20.
- Tongu EA de O, Segabinazzi LGTM, Alvarenga ML, Monteiro A, Papa FO, Alvarenga MA. Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares. *Theriogenology*. 2021 Jul; 169:1–8.
- Troedsson MHT, Ababneh MM, Ohlgren AF, Madill S, Vetscher N, Gregas M. Effect of periovulatory prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on pregnancy rates and luteal function in the mare. *Theriogenology*. 2001 Jun;55(9):1891–9.
- Troedsson MHT, Liu IKM, Ing M, Pascoe J, Thurmond M. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Reproduction*. 1993 Nov 1;99(2):307–13.
- Troedsson MHT, Liu IKM, Ing M, Pascoe J. Smooth Muscle Electrical Activity in the Oviduct, and the Effect of Oxytocin, Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ , and Prostaglandin E<sub>2</sub> on the Myometrium and the Oviduct of the Cycling Mare<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 1995 Jan 1;52(monograph\_series1):475–88.
- Troedsson MHT, Møller Nielsen J. Non-antibiotic treatment of equine endometritis. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*. 2018;34(1):17–22.

- Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 1999 Aug;52(3):461–71.
- Tsunoda RH, Celeghini ECC, Arruda RP, Recalde ECS, Oliveira BMM, Nichi M, et al. The effect of semen extender supplemented with pentoxifylline on post-breeding inflammation response assessed by endometrial cytology. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2014 Jan;34(1):156.
- Túnón AM, Rodriguez-Martinez H, Haglund A, Albiñá A, Magnusson U, Einarsson S. Ultrastructure of the secretory endometrium during oestrus in young maiden and foaled mares. *Equine Veterinary Journal*. 1995 Sep;27(5):382–8.
- Turner M, Healey G, Sheldon I. Immunity and Inflammation in the Uterus. *Reproduction in Domestic Animals* [Internet]. 2012 Jul 25 [citado 2019 Sep 11]; 47:402–9. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2012.02104.x>
- Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W, Vandenaabeele P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death & Differentiation*. 1999 Nov;6(11):1117–24.
- Van der Hoek KH, Woodhouse CM, Brännström M, Norman RJ. Effects of Interleukin (IL)-6 on Luteinizing Hormone- and IL-1 $\beta$ -Induced Ovulation and Steroidogenesis in the Rat Ovary1. *Biology of Reproduction*. 1998 May 1;58(5):1266–71.
- Van Der Holst M. Experiences with oral administration of beta-carotene to pony mares in early spring. *Proc. 35th Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod.* 1984.
- Van Niekerk FE, Van Niekerk CH. The effect of dietary protein on reproduction in the mare. IV. Serum progestagen, FSH, LH and melatonin concentrations during the anovulatory, transitional and ovulatory periods in the non-pregnant mare. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1997 Jul 13;68(4).
- Vanderwall DK, Woods GL. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association* [Internet]. 2003 Apr 15 [citado 2021 May 4];222(8):1108–10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12710775/>
- Vasseur P. The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology*. 2005 Mar 1;151(3):985–97.
- von Reitzenstein M, Callahan MA, Hansen PJ, LeBlanc MM. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. *Theriogenology*. 2002 Sep;58(5):887–98.
- Walport MJ. Complement. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344:1058–66.
- Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. *Drugs*. 1987 Jul;34(1):50–97.

Watson ED, Stokes CR, Bourne FJ. Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1987 Sep;16(1-2):107–21

Watson ED, Stokes CR, Bourne FJ. Influence of arachidonic acid metabolites in vitro and in uterine washings on migration of equine neutrophils under agarose. *Research in Veterinary Science*. 1987 Sep;43(2):203–7.

Watson ED. Opsonins in uterine washings influencing in vitro activity of equine neutrophils. *Equine Veterinary Journal*. 1988 Nov;20(6):435–7.

Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc. Natl. Acad. of Sci*. 1976 Sep;73(9):3268–72.

Wolfsdorf KE. How to utilize endometrial culture, cytology, and biopsy to manage the sub-fertile mare. *American Association of Equine Practitioners (AAEP)*, Lexington. 2016;164-8.

Woodward E, Christoffersen M, Campos J, Horohov D, Scoggin K, Squires E, et al. An Investigation of Uterine Nitric Oxide Production in Mares Susceptible and Resistant to Persistent Breeding-Induced Endometritis and the Effects of Immunomodulation. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012 Dec 10;48(4):554–61.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*. 1998 Jan 15;101(2):311–20.

Yovich JL. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Human Reproduction*. 1993 Nov;8(11):1786–91.

Zarezadeh R, Mehdizadeh A, Leroy JLMR, Nouri M, Fayezi S, Darabi M. Action mechanisms of n-3 polyunsaturated fatty acids on the oocyte maturation and developmental competence: Potential advantages and disadvantages. *Journal of Cellular Physiology*. 2018 Aug 2;234(2):1016–29.

Zent W, Troedsson M, Xue JL. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*. 1998; 44:64–5.

Zerbe H, Schuberth HJ, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology*. 2003 Jul;60(2):209–23.

Zeyner A, Harmeyer J. Metabolic functions of L-Carnitine and its effects as feed additive in horses. A review. *Archiv für Tierernaehrung*. 1999 Jan;52(2):115–38.

**HIPOTESE**

A suplementação com pentoxifilina reduzirá a reação inflamatória uterina após inseminação artificial em éguas velhas doadoras de embrião e permitirá uma maior recuperação embrionária.

**OBJETIVO**

Avaliar a resposta inflamatória através de citologia endometrial, acúmulo de fluido intrauterino pré-inseminação (0h) e pós-inseminação (24, 48 e 72h) e a taxa de recuperação embrionária em éguas velhas e subférteis, não suplementadas, suplementadas apenas com nutracêuticos ou com associação do nutracêutico com pentoxifilina.

## **CAPÍTULO 2**

## ARTIGO

**Oral supplementation with pentoxifylline in post breeding inflammatory response and embryo recovery rate in old 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.

Odilon M Oliveira,<sup>a,1</sup> Gabrielle BAG Amorim,<sup>a,1</sup> Lorenzo GTM Segabinazzi,<sup>b,1</sup> Simone Perecmanis,<sup>c</sup> Rodrigo Arruda,<sup>c,1</sup> Fabiano JF Santana,<sup>c</sup> Igor F. Canisso<sup>d,\*</sup>

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 first authors.

Correspondent author

Igor F. Canisso DVM, MSc, PhD, DACT, DECAR (Equine Reproduction)

Associate Professor of Theriogenology

Department of Veterinary Clinical Medicine, College of Veterinary Medicine,

University of Illinois Urbana-Champaign.

\*E-mail: [canisso@illinois.edu](mailto:canisso@illinois.edu)

**HIGHLIGHTS**

- ❖ Pentoxifylline as an alternative to improve the post-breeding uterine clearance.
- ❖ Transiently increase uterine neutrophils after breeding.
- ❖ Uterine edema, fluid and culture did not differ across supplement, washout and pentoxifylline.
- ❖ Embryo recoveries were higher during pentoxifylline treatment.

### Abstract

Most embryo donor mares have impaired uterine clearance. Uterine and cervical issues lead to persistent breeding induced endometritis (PBIE) that is associated with persistent inflammation as excessive uterine edema, intrauterine fluid accumulation (IUF), elevated polymorphonuclear cells on cytology and positive culture. Pentoxifylline is an anti-inflammatory and rheolytic drug used in the clinical practice but also in reproduction enhancing the blood flow to the tissues. This study aimed to assess the post-breeding inflammatory response and embryo recovery of sub fertile aged donor mares treated with pentoxifylline. Twelve mares ( $16\pm 3.7$  years old) were classified as susceptible or resistant to PBIE based on the reproductive history, IUF and embryo recovery rate. Six estrous cycles were assessed for each mare. In the first two cycles, mares received orally, 50mL of a commercial supplement added with 17mg/kg/day of Pentoxifylline. The two subsequent cycles were used as washout. In the last two cycles, 50mL of oral supplement without pentoxifylline. Embryo flushing was carried out eight or nine days after ovulation. Transrectal palpation and ultrasonography were performed daily to assess follicular control, endometrial edema and IUF. Uterine cytology was performed pre and post (24, 48, and 72h) artificial insemination while uterine culture was performed pre and 72h post insemination. Neutrophil counts related to effects of time did not differ across groups as well as uterine edema and intrauterine fluid accumulation ( $P>0.05$ ). Embryo recovery was greater in the pentoxifylline group ( $P=0.046$ ). In conclusion, supplementation with pentoxifylline may be an alternative to decrease post-breeding inflammatory response and may enhance embryo recovery.

**Keywords:** Endometritis, fertility, donor mares, supplement, uterine fluid.

## 1. INTRODUCTION

Most donor mares in embryo transfer programs have impaired uterine clearance due to uterine and cervical problems. According to Ferris (2017) and LeBlanc et al. (2009), the uterus of a healthy mare has the ability to clean against bacteria and fungi without developing infection, however, it becomes susceptible when there is a failure in the body's defense mechanisms, such as: poor perineal conformation, cervical defect, pendulous uterus, poor body condition, impaired myometrial activity, or impaired immune defense (Overbeck et al. 2011; Troedsson et al. 2018).

In addition, repeated breeding cycles, gynecological procedures, and embryo flushing make embryo donors prone to endometritis. Equine endometritis can be associated with microorganisms' infection or after breeding (Troedsson et al. 2001), becoming a multifactorial problem, which impairs the diagnosis (Canisso et al. 2016; Nocera et al. 2021).

After thirty minutes of semen deposition in the uterine lumen, the immune system responds with chemotaxis and activation of neutrophils polymorphonuclear (PMNs) (Canisso et al. 2016, Katilla 1995, Troedsson 1999). The endometrial inflammatory peak occurs between twelve and twenty-four hours (Card, 2005). In susceptible mares, the time to resolution of uterine inflammation increases when inflammatory response lasts for up to 96 hours (Segabinazzi et al. 2020; Zent et al. 1998).

Cytokines modulate the uterine inflammatory response after insemination; however, susceptible mares show lower expression of IL-10 mRNA (anti-inflammatory cytokine) and higher expression of IL-6 (pro-inflammatory cytokine), TNF $\alpha$ , IL1RA, IFN $\gamma$  (interferon gamma) leading to decreased response to pathogens and non-viable cells, resulting in intense and prolonged inflammation and consequent infertility (Canisso et al., 2016; Fumuso et al., 2003).

An extracellular neutrophil trap (NETs) is formed to assist in uterine clearance, elimination of bacteria and in the release of inflammatory mediators (Canisso et al. 2016; Rebordão et al. 2014). NETs are induced by antigen-antibody complexes, reactive oxygen species, CXCL8, lipolysis, and other

inflammatory agents, and have immunomodulatory and antimicrobial properties (Brinkmann et al. 2004; Fuchs et al. 2007; Garcia-Romo et al. 2011; Logters et al. 2009). A decrease in the degradation of the extracellular neutrophil network or an overstimulation in the formation of this network can increase the chances of endometrial fibrosis and impair the secretory function of the endometrium (Canisso et al. 2016).

Persistent neutrophilia, increased production of pro-inflammatory cytokines and intrauterine fluid accumulation create a hostile environment with embryotoxic factors (Knutti et al. 2010; Robertson et al. 2018) with potential to impair embryonic migration from the uterine tube to the uterus (Freeman et al. 1991) and decrease embryonic survival contributing to reduced fertility (Díaz-Bertrana et al. 2021).

Excessive uterine edema, intrauterine fluid during diestrus, large volume or echogenic uterine fluid during estrus, and hyperemia of the cervix are strong clinical signs that suggest infectious endometritis, which is something that happens very often in old mares with reduced fertility. Uterine cytology and culture are essential for the diagnosis of endometritis and are used in identifying the degree of inflammation (Ferris et al. 2015; Ferris et al. 2016; Overbeck et al. 2011). Bacterial endometritis can be classified as acute, when a mare develops an infection after exposure to the pathogen, and chronic, when even after adequate therapy, the infection persists (Ferris, 2017).

Pentoxifylline is a synthetic methylxanthine rheolytic drug (Ward et al. 1987) with anti-inflammatory (Pollice et al. 2001) and antioxidant (Prasad et al. 2007) properties. It can promote increased malleability of red blood cells (Soria et al. 1990) and increased blood perfusion and tissue oxygenation in places where there is inflammation (Brisnko et al., 2011; Graczy et al. 2006; Leal et al. 2020; Macpherson, 2006).

The effectiveness of pentoxifylline on the reproductive system of mares has not yet been proven, however, it has been used to enhance blood flow in the reproductive tract and reduce uterine inflammation (Bailey et al. 2010).

This study aimed to assess the post-breeding inflammatory response and embryo recovery of subfertile aged donor mares treated with pentoxifylline. It was hypothesized that pentoxifylline supplementation mitigates the post-breeding inflammatory response in embryo donor mares.

## 1. MATERIALS AND METHODS

This study was revised and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Brasilia, under protocol #23106.048736/2021-19. The study was conducted from November 2020 to April 2022.

### *Animals and husbandry*

The study was conducted with seven commercial embryo donor mares in an embryo transfer facility located in Planaltina, Federal District, Brazil (15°29'59.1"S 47°38'13.5"W) and five light-breed mares belonging to the University of Brasília (UnB), Água Limpa Farm located in Vargem Bonita, Federal District, Brazil (15°56'45"S 47°56'8"W). The mares (12) were all over 13 years old (16±3.7years old; 13±3 years donating embryos) weighing 350 to 450 kg. Immediately 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 with free access to water and mineral salt blocks. The mares used in the study had history of subfertility and susceptibility to persistent breeding-induced endometritis.

### *Experimental Design*

Twelve mares (16±3.7years old) were screened for susceptibility to PBIE and scored according to Kenney and Doing classification (1986) based on the reproductive history (three or more negative embryo flushes), ultrasound findings (exacerbated endometrial edema and accumulation of intrauterine fluid

pre and/or post insemination) and low embryo recovery rate. All mares were used as embryo donors for several consecutive breeding seasons. Two stallions (Mangalarga and Quarter Horse breeds) were used for the research. The semen was collected with a Botucatu artificial vagina model (Botupharma®, Botucatu, Brazil). After collection, raw semen was diluted with Botusemen extender (Botupharma®, Botucatu, Brazil) or INRA 96 extender (IMV Technologies) and all mares were bred with  $1 \times 10^9$  viable sperm cells.

### *Breeding management and embryo flushing*

Each mare was studied during six estrus cycles. The onset of the study had the confirmation of one ovulation and endometrial biopsy followed by an application of 5mg of Dinoprost (1mL, i.m., Lutalyse, Zoetis, USA) at eight days post ovulation.

Mares had rectal palpation and ultrasonography examination performed every other day until early estrus (28-30 mm) was detected. Thereafter, when the mares reached a follicular diameter of 35mm in the presence of endometrial edema score  $\geq 1$ , endometrial culture and cytology were obtained. Ovulation was hastened with 250  $\mu$ g (micrograms) of histrelin acetate (1 mL, i.m., Strelin®, Botupharma, Botucatu, Sao Paulo, Brazil).

During the first two cycles, all mares were orally supplemented with fifty milliliters (50mL) of a commercial supplement added with 17mg/kg/day of pentoxifylline (Group: Pentoxifylline). The two subsequent cycles were used as washout (Group: Washout), where there was no supplement and pentoxifylline administration, but only follow-up of the cycles, artificial insemination, embryo collection and data collection for cytology and culture. The last two cycles (Group: Supplement), 50ml of the commercial supplement without addition of pentoxifylline was orally provided. Each group analysis ended up after embryo collection and new administration of 5mg of dinoprost on the second cycle.

Embryo flushing was carried out between eight and nine days after ovulation with Lactate Ringer's solution. The recovered uterine fluid was drained into a filter, and embryos were searched, located, separated, and graded.

### *Ultrasonography*

Rectal palpation and ultrasonography examination was performed with a portable ultrasound (Veterinary Ultrasound A5v SonoScape) coupled with a 7 MHz linear transducer. Endometrial edema was classified as 0, no edema; 1, mild edema; 2, moderate edema; 3, evident edema; 4, exacerbated edema. If intrauterine fluid accumulation was present, the height and the width of the fluid column (mm<sup>2</sup>) 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) (Rasmussen et al. 2015).

### *Endometrial cytology*

Endometrial exfoliative cytology was performed pre- (0 h) and post (24, 48, and 72 h) artificial insemination. The samples were obtained by inserting a disposable cytobrush 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× objective, and the number of inflammatory cells in ten higher power fields were counted. An evaluator blinded of the treatment assessed all the samples. Positive endometrial cytology was defined as  $\geq 3$ -5 PMNs per high-power-field.

Twenty-four hours after breeding, uterine cytology was performed followed by uterine lavage with Lactate Ringer's Solution (LRS) and then, 20 IU (2 ml, i.m.) of oxytocin were administered to aid in uterine cleaning.

### *Aerobic culture*

Uterine culture was performed pre- (0h) and post (72h) artificial insemination by inserting a sterile double guarded swab into the uterine lumen. The uterine swabs were transported in Stuart media to the microbiology laboratory, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia.

Upon arrival, samples were streaked over blood agar and Cled agar (Cystine Lactose Electrolyte Deficient) for isolation of general bacteria colonies, EMB agar (Eosin-Methylene Blue) and MacConkey agar specific for gram negative bacterias, and BHI broth (Brain Heart Infusion) to save bacteria for posterior tests. All media and broths were incubated for 24h up to 72h at 37oC. When positive, isolates were identified using standard microbiological testing such as Gram staining, KOH (Potassium Hydroxide Test), Catalase test, biochemistry tests such as: OF (Oxidation-Fermentation) Test, IMViC (Indol, Methyl Red (MR) and Voges-Proskauer (VP), Triple Sugar Iron (TSI) and Citrate), Urea, Phenyl, Lisine, Glucose, Sacarose, and streaking over Manitol agar for gram positive bacteria and chromogenic agar. Muller-Hinton media was used for antibiogram sensitivity test.

## **2. STATISTICS**

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.

## **3. RESULTS**

Neutrophil (PMN) count at 0h and 48h post insemination showed a real difference between the pentoxifylline and washout groups, being lower in the first group; whereas there was no difference in the supplement group compared to the other two groups. At 24h, there was no significant difference between groups. While at 72h, the supplement group showed a difference with a higher PMN count in relation to the other two groups (Figure 1).

The results obtained in the PMN count indicate a transient inflammatory reaction. The antioxidant action of pentoxifylline in suppressing neutrophil activation in association with the anti-inflammatory action promoting reduction of pro-inflammatory cytokines possibly lead to a lower influx of PMNs and lower inflammatory reaction.

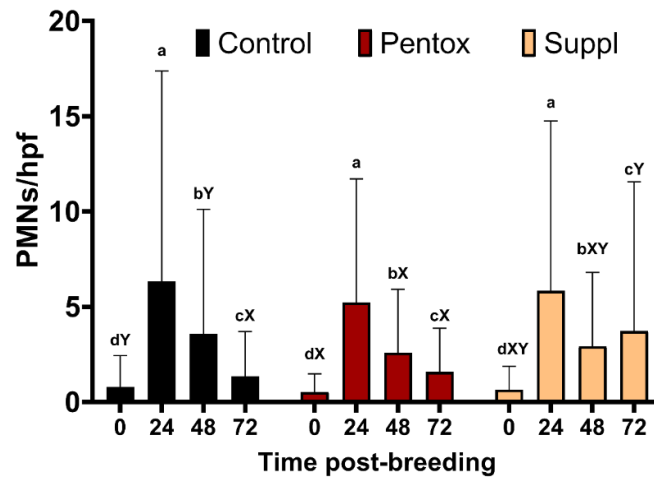


Figure 1. Mean polymorphonuclear cells (PMNs) assessed in 10 high-power fields (hpf) (400x) in endometrial cytology performed pre- (0 h) and post- (24, 48, and 72 h) artificial insemination. Positive endometrial cytology was defined as  $\geq 3$ -5 PMNs per high-power-field. Mares (n=12) had two estrous cycles assigned to receive 17mg/kg/day of Pentoxifylline added to a commercial supplement (Pentox), two cycles as washout group (Control) and two cycles assigned to receive plain commercial supplement (Suppl). Different superscripts denote the effects of time (a,b,c,d) and differences between groups (X,Y) ( $P < 0.05$ ).

There was a significant difference in the pentoxifylline group embryo recovery rate, showing that in general, the drug enhanced embryo recovery comparing to the other two groups. Followed by the washout group with 54% that can have suffered cumulative effect of pentoxifylline. And last, the supplement group showing a smaller recovery rate (Table 1 and Figure 2).

	PENTOXIFYLLINE	WASHOUT	SUPPLEMENT
EMBRYO RECOVERY	0.75±0.73	0.54±0.58	0.37±0.57

Table 1. Media and standard deviation of the embryonic recovery rate of all animals in the 3 groups analyzed.

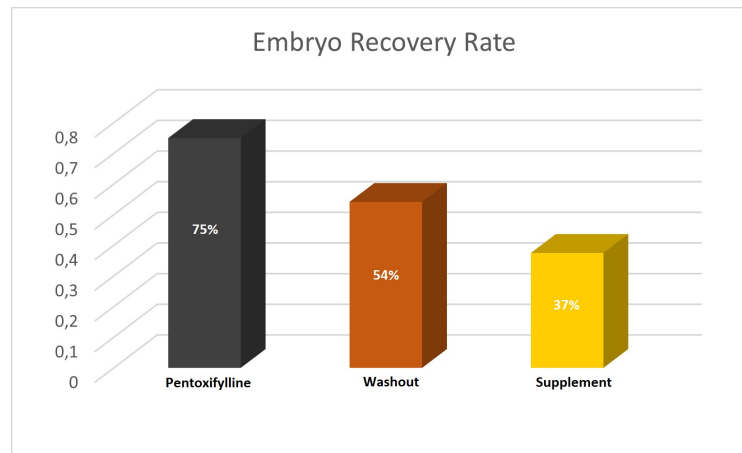


Figure 2. Percentage of embryonic recovery rate. Analysis of the pentoxifylline group treated with 17mg/kg/day of pentoxifylline added to commercial supplement (75%); washout group (control) (54%); and supplement group (37%) treated with commercial supplement. Denoting the embryonic recovery rate being higher in the Pentoxifylline group in relation to the other groups.

Analyzing only the old and susceptible mares (7/12), we observed that embryonic recovery was much higher in the group treated with pentoxifyphiline when compared to the other two groups. Resistant mares didn't show difference between groups (Table 2 and Figure 3).

	PENTOXIFYLLINE	WASHOUT	SUPPLEMENT
EMBRYO RECOVERY (7/12)	0.85±0.86	0.28±0.46	0.28±0.46

Table 2. Media and standard deviation of the embryonic recovery rate of the 7 mares susceptible to endometritis in the 3 groups analyzed.

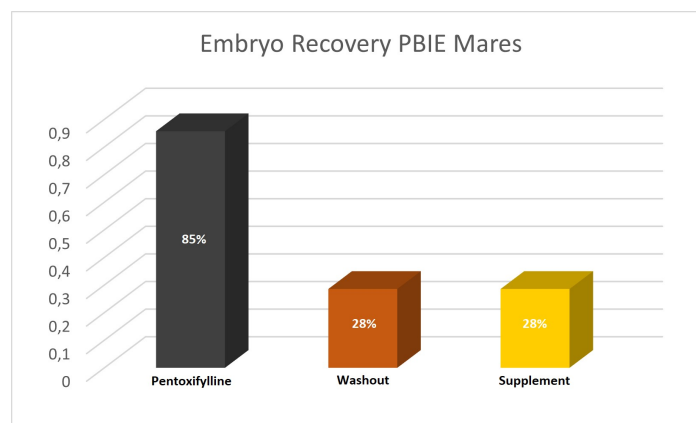


Figure 3. Percentage of embryonic recovery rate on the 7 mares with susceptibility to endometritis. Analysis of the pentoxifylline group treated with 17mg/kg/day of pentoxifylline added to commercial supplement (85%); washout group (control) (28%); and supplement group (28%) treated with commercial supplement. Denoting the embryonic recovery rate being higher in the Pentoxifylline group in relation to the other groups.

#### 4. DISCUSSION

The results obtained in the PMN count indicate a transient inflammatory reaction after artificial insemination as described by Katila (2016). After the deposition of semen in the uterus, the complement system gets activated, which is responsible for the influx and activation of PMNs and the peak of inflammation occurs between 12 and 24 hours after insemination (Canisso et al., 2016) as observed in the 3 groups studied.

These results may suggest that pentoxifylline has a slight benefit in the inflammatory process by having a lower PMN count at 0h and 48h post-insemination compared to the washout group and lower at 72h compared to the supplement group and they show important mechanisms for the resolution of the inflammatory process within 48 hours after artificial insemination, suggesting an increase in anti-inflammatory cytokines and a decrease in pro-inflammatory cytokines (Canisso et al., 2020). Pollice et al. (2021) and Prasad et al. (2007) described the antioxidant action of pentoxifylline in suppressing neutrophil activation in association with the anti-inflammatory action promoting reduction of pro-inflammatory cytokines possibly leading to a lower influx of PMNs and lower inflammatory reaction (Pozor, 2011).

A prolonged inflammation can be explained by lower expression of anti-inflammatory cytokines in susceptible mares, which leads to intense and prolonged inflammation (Canisso et al., 2016; Fumoso et al., 2007.), inducing increased neutrophil chemotaxis and reducing chances of embryonic survival and decreasing fertility (Díaz-Bertrana et al., 2021).

There are no studies in the literature that report the effects of pentoxifylline on the reproductive tract of mares with persistent post breeding endometritis, however, Novick (1991) described the application of pentoxifylline in the treatment of pathologies that involve overproduction of inflammatory cytokines. Other studies proved the positive effects of pentoxifylline on other tissues, such as Macpherson (2006) and Graczyk et al. (2006) who stated that pentoxifylline has good uterine penetration and was detected in fetal membranes. There are reports of benefits of this drug on the endotoxin-induced placental inflammation as it showed the anti-inflammatory property by inhibiting inflammatory mediators and protecting mare and fetus against exacerbated

inflammatory reaction (Speer et al., 2017; Kim et al., 2015). Improvements were also observed in testicular microcirculation (Pozor et al., 2011), lameness (Jacoby et al., 2004) and blood perfusion in equine hooves (Leal et al., 2020).

It has been described that the immunomodulatory property of pentoxifylline can inhibit the inflammatory response, influencing reproductive performance and improving fertility by interfering with the release of cytotoxic and embryotoxic factors that affect embryonic development (Barthwal et al., 1990; Dachung et al., 1989; Steinleitner et al., 1991a; Steinleitner et al., 1991b; Takeuchi et al., 1990).

A study associating pentoxifylline with vitamin E showed that, between six to twelve months of treatment, there was regression of radiation-induced uterine fibrosis in human patients (Delanian et al., 1999) and improvement in endometrial thickness, increase in myometrial volume and reappearance of diastolic flow of the uterine artery (Letur-Konirsch et al., 2002). Improvements in echogenicity, vascularization and endometrial thickness were also observed after 9 months of treatment with 800mg PTX plus vitamin E, without causing adverse effects (Letur-Konirsch et al., 2003).

According to Pelehach et al. (2002), the development of endometrial edema is associated with an increase in circulating estrogen levels, with the proximity of ovulation, estrogen levels fall along with endometrial edema; and the present study didn't show any significant difference in endometrial edema across groups.

There was no difference in intrauterine fluid accumulation between groups, however, it is suggested that pentoxifylline's anti-inflammatory properties may improve the ability of myometrial contraction and consequent elimination of intrauterine fluids. This hypothesis can be affirmed by Troedsson (1999), that says the failure in the anti-inflammatory response in susceptible mares impaired the duration, intensity and frequency of myometrial contractions. The mare's inability to contract the uterus efficiently reduces the elimination of contaminants and fluids according to Ferris (2017). It has been claimed that this inability can be induced by a lack of endometrial PGF<sub>2</sub>alpha and an increase in nitric oxide (Alghamdi et al., 2005; Woodward et al., 2013).

It is also suggested that pentoxifylline may increase prostaglandin synthesis (Meru et al., 2006) by improving the mechanism of myometrial

contraction and elimination of intrauterine fluids after insemination, in addition to minimizing the injuries caused to the endometrium by neutrophil infiltration (Baumgartner, 2007).

According to Segabinazzi et al. (2021), mares susceptible to post-breeding persistent endometritis present persistent inflammatory reaction and inability to promote uterine cleansing between 24 and 72 hours after artificial insemination, compromising embryonic recovery and pregnancy rates, due to the uterine microenvironment being unfavorable to embryonic maintenance.

A different embryonic recovery rate was observed in the group treated with pentoxifylline which showed an increase in embryo recovery, a fact that was not observed by Gomes et al. (2014) after supplementation with Promater®. In a study from Childs et al. (2008), the supplementation with omega 3 in beef cattle didn't show any effects on embryo recovery rate and embryonic quality, as also observed in the work of Bader et al. (2005) where multiparous beef cows were supplemented with lipids and did not suffer any influence on the quantity and quality of recovered embryos.

The general analysis of embryo recovery showed that the washout group presented a higher rate than the supplement group; however, it is believed that the two cycles following treatment with pentoxifylline may have benefited from the residual effect of the drug. In the group of mares susceptible to endometritis (7), the rate was the same for the washout and supplement groups and higher in the group treated with pentoxifylline. It is assumed that the association of supplement with pentoxifylline enhances the embryo recovery rate by improving blood circulation.

The present study suggests that, with the increase in circulation and vascularization of several tissues (Brisko et al., 2011) associated with the reduction in the synthesis of reactive oxygen species (Perelló et al., 2017), pentoxifylline may have promoted a better blood supply to the ovaries, improving oocyte quality and, consequently, increasing embryo recovery rate (Catandi et al., 2022; Zarezadeh et al., 2018).

## **5. CONCLUSION**

Mares in the study were subfertile older mares used as embryo donors for multiple years, thus, justifying the low embryo recovery for the cycles with no pentoxifylline. In conclusion, supplementation with pentoxifylline may be an alternative to control the post-breeding uterine inflammatory response. It enhanced embryo recovery in mares serving as donors for multiple years.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001.

### **Institutional Review Board Statement**

This study protocol was approved by the University of Brasília Institutional Animal Care and Used Committee, # 23106.048736/2021-19.

**Conflicts of Interest:** None

### **Credit Author Statement**

G.B.A.G. Amorim and O.M. Oliveira contributed to study execution and preparation of the manuscript. L.G.T.M. Segabinazzi contributed to the study design, data analysis, interpretation, and preparation of the manuscript. R. Arruda, F.J.F. Santana and S. Percmanis. contributed with the study execution and sampling analysis. I.F. Canisso contributed to study design, interpretation, and preparation of the manuscript. All authors gave their final approval of the manuscript.

## 6. REFERENCES

- Bader JF, Kojima FN, Wehrman ME, Lindsey BR, Kerley MS, Patterson DJ. Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. *Anim Reprod Sci.* 2005 Jan;85(1-2):61-70. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.033. PMID: 15556309.
- Bailey CS, Macpherson ML, Pozor MA, Troedsson MHT, Benson S, Giguere S, et al. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. *Theriogenology.* 2010 Aug;74(3):402–12
- Baumgartner T. Pentoxifylline. *J. Exotic Pet. Med.* 2007;2:118-21.
- Barthwal M, Srivastava K. Histologic studies on endometrium of menstruating monkeys wearing IUDs: comparative evaluation of drugs. *Adv Contracept* 1990;6:113-24.
- 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, Segabinazzi LGTM, Fedorka CE. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares—A Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020 Feb 20;21(4):1432.
- Canisso IF, Stewart J, Silva MAC.. Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. *Vet Clin Equine.* 2016;3:465-80.
- Card C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology.* 2005;64:580-8.
- Catandi GD, LiPuma L, Obeidat YM, Maclellan LJ, Broeckling CD, Chen T, et al. Oocyte metabolic function, lipid composition, and developmental potential are altered by diet in older mares. *Reproduction.* 2022 Apr 1;163(4):183–98.
- Childs S, Carter F, Lynch CO, Sreenan JM, Lonergan P, Hennessy AA, Kenny DA. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). *Theriogenology.* 2008, Volume 70, Issue 6, Pages 992-1003. ISSN 0093-691X.
- Collingridge DR, Rockwell S. Pentoxifylline improves the oxygenation and radiation response of BA1112 rat rhabdomyosarcomas and EMT6 mouse mammary carcinomas. *International Journal of Cancer.* 2000;90(5):256–64.
- Contri A, De Amicis I, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D, et al. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology.* 2011 Apr;75(7):1319–26.

Dachung T, Xirui W, Biren Z, Yanggiang L, Yu L. Influence of naproxen on uterine PGF2a and antifertility effect of IUDs in rats. *Eicosanoids* 1989;2:47-9.

Deichsel K, Palm F, Koblichke P, Budik S, Aurich C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*. 2008 May;69(8):940-5.

Delanian S, Balla-Mekias S, Lefaix J-L. Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol. *J Clin Oncol* 1999;17:3283-90.

Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. Insights into the regulation of TNF-a production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics*. 2008;63(3):321-8.

Díaz-Bertrana ML, Deleuze S, Pitti Rios L, Yeste M, Morales Fariña I, Rivera del Alamo MM. Microbial Prevalence and Antimicrobial Sensitivity in Equine Endometritis in Field Conditions. *Animals* [Internet]. 2021 May 1 [citado 2022 Apr 8];11(5):1476. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/5/1476/htm>

El-Shahat KH, Abo-El maaty AM. The effect of dietary supplementation with calcium salts of long chain fatty acids and/or l-carnitine on ovarian activity of Rahmani ewes. *Animal Reproduction Science*. 2010 Jan;117(1-2):78-82.

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

Freitas ML, Oliveira RA de. Nutraceutical in male reproduction. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. 2018;40.

Graczyk J, Macpherson ML, Pozor MA, Troedsson MHT, Eichelberger AC, Leblanc MM, et al. Treatment efficacy of trimethoprim sulfamethoxazole and pentoxifylline in equine placentitis. *Animal Reproduction Science*. 2006 Aug;94(1-4):434-5.

Gomes GM, Ramos DDS, Jacob JCJF, Crespilho AM, Cortes PP, Gomes LP de M, et al. Influência da administração do promater® sobre a produção de embriões e perfil hematológico de doadoras de embriões equinos. *Revista de Saúde*. 2016 Sep 27;5(1/2):11.

Katila T. Onset and Duration of Uterine Inflammatory Response of Mares after Insemination with Fresh Semen. *Biology of Reproduction*. 1995 Jan 1;52(monograph\_series1):515-7.

Kim CJ, Romero R, Chaemsaihong P, Kim JS. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213, 2015. 53-S69.

Leal L, Nogueira EWC. Tratamento conservativo de avulsão no casco de um equino- relato de caso. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão.* 2020 Feb 14; 8(1).

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 M, Causey R. Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction in Domestic Animals.* 2009 Sep;44:10–22.

Letur-Koñirsch H, Guis F, Delanian S. Uterine restoration by radiation sequelae regression with combined pentoxifylline-tocopherol: a phase II study. *Fertil Steril* 2002;77:1219–26.

Letur-Koñirsch H, Delanian S. Successful pregnancies after combined pentoxifylline-tocopherol treatment in women with premature ovarian failure who are resistant to hormone replacement therapy. *Fertility and Sterilit.* 2003 feb;79.

Macpherson ML. Diagnosis and Treatment of Equine Placentitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.* 2006 Dec;22(3):763–76.

Meru VA, Mitra S, Thyagarajan B, Chugh A. Intermittent claudication: Na overview. *Atherosclerosis.* 2006;187(2):221-37.

Mesa AM, Warren LK, Sheehan JM, Kelley DE, Mortensen CJ. L-Arginine supplementation 0.5% of diet during the last 90 days of gestation and 14 days postpartum reduced uterine fluid accumulation in the broodmare. *Animal Reproduction Science.* 2015 Aug;159:46–51.

Nocera FP, Ambrosio M, Conte A, Palma TD, Castaldo S, Pasolini MP, Fiorito F, Martino LD. Importance of broth-enrichment culture in equine endometritis diagnosis. *New Microbiologia.* 2021;44(1):19-23.

Novick WJ Jr. Pentoxifylline and leukocyte function. *Crit Care Rep* 1991;2:236-40.

Ott E, Lechner H, Fazekas F. Hemorheological Effects of Pentoxifylline on Disturbed Flow Behavior of Blood in Patients with Cerebrovascular Insufficiency. *European Neurology.* 1983;22(1):105–7.

Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology.* 2011 Apr;75(7):1311–8.

Pelehach LM, Greaves HE, Porter MB, Desvouses A, Sharp DC. The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. *Theriogenology.* 2002 Aug;58(2-4):441–4.

Perelló M, González-Foruria I, Castillo P, Martínez-Florensa M, Lozano F, Balasch J, et al. Oral Administration of Pentoxifylline Reduces Endometriosis-Like Lesions in a Nude Mouse Model. *Reproductive Sciences*. 2016 Oct 12;24(6):911–8.

Pollice PF, Rosier RN, Looney RJ, Puzas JE, Schwarz EM, O’Keefe RJ. Oral Pentoxifylline Inhibits Release of Tumor Necrosis Factor-Alpha from Human Peripheral Blood Monocytes. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2001 Jul;83(7):1057–61.

Pozor MA, Muehlhaus J, King A, Macpherson ML, Troedsson MH, Bailey CS. Effect of pentoxifylline treatment on testicular perfusion and semen quality in Miniature horse stallions. *Theriogenology*. 2011 Oct;76(6):1027–35.

Prasad K, Lee P. Suppression of hypercholesterolemic atherosclerosis by pentoxifylline and its mechanism. *Atherosclerosis*. 2007 Jun;192(2):313–22.

Rasmussen CD, Petersen MR, Bojesen AM, Pedersen HG, Lehn-Jensen H, Christoffersen M. Equine Infectious Endometritis—Clinical and Subclinical Cases. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2015 Feb;35(2):95–104.

Rebordão MR, Carneiro C, Alexandre-Pires G, Brito P, Pereira C, Nunes T, et al. Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of Reproductive Immunology*. 2014 Dec;106:41–9.

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.

Segabinazzi LGTM, Canisso IF, Podico G, Cunha LL, Novello G, Rosser MF, et al. Intrauterine Blood Plasma Platelet-Therapy Mitigates Persistent Breeding-Induced Endometritis, Reduces Uterine Infections, and Improves Embryo Recovery in Mares. *Antibiotics*. 2021 Apr 23;10(5):490.

Schmid-Lausigk Y, Aurich C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. *Theriogenology* [Internet]. 2014 Apr 15;81(7):966–73. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X14000545>

Soria J, Giovannangeli ML, Jolchine IE, Chassoux G. Pentoxifylline, fibrinogen and leukocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1990 Oct;1(4– 5):485–7.

Speer EM, Lin X, Murthy A, Hou W, Islam S, Hanna N. *Pentoxifylline inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in human second trimester placenta explants. Placenta*, 2017, 58, 60–66. doi:10.1016/j.placenta.

Steinleitner A, Lambert H, Roy S. Immunomodulation with pentoxifylline abrogates macrophage-mediated infertility in an in vivo model: a paradigm for a novel approach to the treatment of endometriosis-associated subfertility. *Fertil Steril* 1991;55:26-31.

Steinleitner A, Lambert H, Suarez M, Serpa N, Roy S. Immunomodulation in the treatment of endometriosis-associated subfertility: use of pentoxifylline to reverse the inhibition of fertilization by surgically induced endometriosis in a rodent model. *Fertil Steril* 1991;56:975-9.

Takeuchi K, Mori A, Yamamoto S, Sonoda T, Nagata Y. Effect of the secretions from the IUD-bearing uterus on peri-implantation mouse embryos. *Contraception* 1990;41: 655-62.

Troedsson MHT, Møller Nielsen J. Non-antibiotic treatment of equine endometritis. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*. 2018;34(1):17–22.

Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 1999 Aug;52(3):461–71.

Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. *Drugs*. 1987 Jul;34(1):50–97.

Wolfsdorf KE. How to utilize endometrial culture, cytology, and biopsy to manage the sub-fertile mare. *American Association of Equine Practitioners (AAEP)*, Lexington. 2016;164-8.

Zarezadeh R, Mehdizadeh A, Leroy JLMR, Nouri M, Fayezi S, Darabi M. Action mechanisms of n-3 polyunsaturated fatty acids on the oocyte maturation and developmental competence: Potential advantages and disadvantages. *Journal of Cellular Physiology*. 2018 Aug 2;234(2):1016–29.

Table 1. Descriptive breeding management of commercial embryo donor mares in the experiment. (NMI: No Microorganisms; NER: No Embryo Recovery).

Mare#	Group	Cycle	Culture 0H Pre AI	Culture 72H Post AI	Semen Prog Mot (%)	Embryo recovery and quality	Transfer results
1	Pentoxifylline	1	NMI	Enterobacter sp.; E. coli	60%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Pentoxifylline	2	Enterobacter	E. coli; Enterococcus sp.	60%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Washout	1	NMI	Enterobacter sp.; Enterococcus	55%	Blastocyst, grade 1	Not pregnant
	Washout	2	NMI	NMI	50%	NER	-
	Supplement	1	Pseudomonas sp.; E. coli	NMI	65%	NER	-
	Supplement	2	Pseudomonas sp.; Enterococcus sp.	NMI	60%	Blastocyst, grade 1	Not pregnant
2	Pentoxifylline	1	NMI	NMI	60%	3 Blastocysts, grade 1	2 Pregnant
	Pentoxifylline	2	NMI	NMI	55%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Washout	1	Pseudomonas	Enterobacter	55%	NER	-
	Washout	2	Enterococcus sp.; Enterobacter sp.; Staphylococcus sp.	NMI	50%	NER	-
	Supplement	1	Pseudomonas sp.; Enterobacter sp.	NMI	60%	NER	-
	Supplement	2	Streptococcus sp.	NMI	55%	NER	-
3	Pentoxifylline	1	Staphylococcus sp.; Enterobacter sp.; Streptococcus sp.	Enterobacter sp.; E. coli	60%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Pentoxifylline	2	Bacillus sp.	E. coli; Enterobacter sp.	50%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Washout	1	NMI	NMI	55%	NER	-
	Washout	2	Enterobacter sp.; E. coli; Streptococcus sp.	Proteus sp.	60%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Supplement	1	Klebsiella sp.; Serratia sp.	Klebsiella sp.; Serratia sp.	55%	Blastocyst, grade 3	Not pregnant
	Supplement	2	NMI	Enterobacter sp.; E. coli; Enterococcus sp.	60%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
4	Pentoxifylline	1	Enterobacter sp.	NMI	50%	NER	-
	Pentoxifylline	2	E. coli	E. coli; Enterococcus sp.	55%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Washout	1	Enterobacter sp.	E. coli	70%	NER	-
	Washout	2	NMI	Enterobacter sp.	60%	Blastocyst, grade 2	Not pregnant
	Supplement	1	E. coli; Enterobacter sp.	Enterobacter	60%	NER	-
	Supplement	2	E. coli; Enterococcus sp.	E. coli; Enterobacter sp.	55%	NER	-
5	Pentoxifylline	1	Enterococcus sp.	Enterococcus sp.	55%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Pentoxifylline	2	Enterobacter sp.	Enterobacter sp.	60%	2 Blastocysts, grade 1	2 Pregnant
	Washout	1	Enterobacter sp.	Enterobacter sp.; Enterococcus	70%	NER	-
	Washout	2	Enterobacter sp.	Enterococcus sp.	50%	Blastocyst, grade 1	Pregnant
	Supplement	1	Enterobacter sp.	NMI	70%	Blastocyst, grade 2	Not pregnant

	Supplement	2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.; <i>E. coli</i>	55%	NER	-
	Pentoxifylline	1	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	55%	NER	-
	Pentoxifylline	2	<i>Enterobacter</i> sp.; <i>Enterococcus</i> sp.	NMI	60%	NER	-
6	Washout	1	<i>Enterococcus</i> sp.	NMI	70%	NER	-
	Washout	2	<i>Enterobacter</i> sp.	NMI	55%	NER	-
	Supplement	1	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	60%	NER	-
	Supplement	2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.	50%	NER	-
	Pentoxifylline	1	NMI	<i>Staphylococcus</i> sp.; <i>Enterococcus</i> sp.	55%	NER	-
	Pentoxifylline	2	NMI	<i>Enterobacter</i> sp.; <i>E. coli</i>	65%	NER	-
7	Washout	1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	55%	NER	-
	Washout	2	NMI	<i>Staphylococcus</i> sp.	70%	NER	-
	Supplement	1	<i>Enterobacter</i> sp.	NMI	65%	NER	-
	Supplement	2	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.	55%	NER	-
	Pentoxifylline	1	<i>Actinomyces</i> sp.; <i>Streptococcus</i> sp.	<i>E. coli</i>		NER	-
	Pentoxifylline	2	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.; <i>Enterobacter</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
8	Washout	1	<i>Enterobacter</i> sp.; <i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.; <i>Staphylococcus</i> sp.	80%	2 Blastocysts, grade 1 and 2	-
	Washout	2	<i>Staphylococcus</i> sp.	NMI	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Supplement	1	<i>Enterococcus</i> sp.; <i>Enterobacter</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.; <i>Enterobacter</i> sp.	80%	NER	-
	Supplement	2	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Pentoxifylline	1	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Pentoxifylline	2	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
9	Washout	1	<i>Enterobacter</i> sp.; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Washout	2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Supplement	1	<i>Bacillus</i> sp./ <i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Supplement	2	<i>Staphylococcus</i> sp./ <i>Bacillus</i> sp.	<i>Actinobacillus</i> sp. Ou <i>Serratia</i> sp.	80%	NER	-
	Pentoxifylline	1	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	80%	NER	-
	Pentoxifylline	2	NMI	<i>Streptococcus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
10	Washout	1	NMI	<i>E. coli</i>	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Washout	2	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.; <i>Streptococcus</i>	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Supplement	1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> sp.	80%	2 Blastocysts, grade 1 and 2	-
	Supplement	2	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>E. coli</i>	80%	NER	-
	Pentoxifylline	1	NMI	<i>Staphylococcus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Pentoxifylline	2	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	80%	NER	-
11	Washout	1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-
	Washout	2	<i>Staphylococcus</i> sp; <i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	80%	NER	-
	Supplement	1	<i>Staphylococcus</i> sp.; <i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.; <i>Streptococcus</i> sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-

Supplement	2	NMI	Bacillus sp.; Enterobacter sp.	80%	NER	-	
Pentoxifylline	1	Staphylococcus sp.	Staphylococcus sp.; Streptococcus sp.	80%	NER	-	
Pentoxifylline	2	Enterobacter sp.; Staphylococcus sp.	Staphylococcus sp.	80%	Blastocyst, grade 1	-	
12	Washout	1	Staphylococcus sp.; Bacillus sp.	Staphylococcus sp.; Streptococcus sp.; Bacillus sp.	80%	NER	-
	Washout	2	NMI	NMI	80%	Blastocyst, grade 1	-
Supplement	1	Bacillus sp.; Corynebacterium sp.	Bacillus sp.; Staphylococcus sp.	80%	NER	-	
Supplement	2	Staphylococcus sp.	Corynebacterium sp.; Staphylococcus sp.	80%	NER	-	

Table 2. Embryo recovery and quality in the pentoxifylline, washout and supplement groups. (NER: No Embryo Recovery)

#	Cycle	PENTOXI	WASHOUT	SUPPLEMENT
		Embryo recovery and quality	Embryo recovery and quality	Embryo recovery and quality
1	1	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1	NER
	2	Blastocyst, grade 1	NER	Blastocyst, grade 1
2	1	3 Blastocysts, grade 1	NER	NER
	2	Blastocyst, grade 1	NER	NER
3	1	Blastocyst, grade 1	NER	Blastocyst, grade 3
	2	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1
4	1	NER	NER	NER
	2	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 2	NER
5	1	Blastocyst, grade 1	NER	Blastocyst, grade 2
	2	2 Blastocysts, grade 1	Blastocyst, grade 1	NER
6	1	NER	NER	NER
	2	NER	NER	NER
7	1	NER	NER	NER
	2	NER	NER	NER
8	1	NER	2 Blastocysts, grade 1 and 2	NER
	2	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1
9	1	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1
	2	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1	NER
10	1	NER	Blastocyst, grade 1	2 Blastocysts, grade 1 and 2
	2	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1	NER
11	1	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1
	2	NER	NER	NER
12	1	NER	NER	NER
	2	Blastocyst, grade 1	Blastocyst, grade 1	NER