



GIOVANNA SANTESSO TAKAKURA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE LAVAGEM
UTERINA COM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA OZONIZADA EM
ÉGUAS**

**LAVRAS - MG
2020**

GIOVANNA SANTESSO TAKAKURA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE LAVAGEM UTERINA COM
SOLUÇÃO FISIOLÓGICA OZONIZADA EM ÉGUAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Professor Dr. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Takakura, Giovanna Santesso.

Avaliação do efeito da utilização de lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada em éguas / Giovanna Santesso Takakura. - 2020.

56 p.

Orientador(a): José Camisão de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Endometrites. 2. Tratamento. 3. Ozonioterapia. I. Souza, José Camisão de. II. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

GIOVANNA SANTESSO TAKAKURA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE LAVAGEM UTERINA COM
SOLUÇÃO FISIOLÓGICA OZONIZADA EM ÉGUAS**

**EVALUATION OF THE EFFECT OF USING UTERINE WASHING WITH
OZONIZED PHYSIOLOGICAL SOLUTION IN MARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2020.

Dra. Ariane Flávia do Nascimento IFMG

Dr. Luis Davi Murgas UFLA

Dr. José Camisão de Souza UFLA

Professor Dr. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2020**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade.

À minha mãe, Maura, por ter me incentivado e ajudado de forma incondicional para que esse sonho fosse possível. Aos meus filhos, José Gabriel e André pela compreensão nos momentos de ausência, esquecimentos e aflições.

Aos médicos veterinários Afonso C. J. Borges, Dra. Perla Fleury e Dra. Maria Augusta Alonso, por trilharem meus passos na reprodução equina e terem me dado oportunidade de aprender e me tornar a profissional que sou hoje.

Ao professor José Camisão, pela orientação, paciência e disposição em ajudar.

Ao professor Flademir Wouters do Setor de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA pela dedicação na confecção das lâminas para histologia e auxílio na interpretação dos resultados.

Aos colegas Flávio José Almada, Virgínia Vilela e estagiárias Júlia Barizon, Jelieny Claudino e Gariella Roque por todo auxílio.

Aos funcionários Edison e Sebastião (Tô) que pacientemente me auxiliaram com o manejo dos animais durante a execução do projeto.

Às meninas da República Poucas & Boas, Mainha, Wonka, Sedex, Rapadura, Android, Granel, Ambev, Pause, Deboche, Agridoce e Luciana pela acolhida e amizade.

À todos os amigos que incentivaram nos momentos mais difíceis.

Muito obrigada.

RESUMO

Diante da prevalência e importância das endometrites nos sistemas de reprodução de equinos, as alternativas para tratamento desta patologia são muito estudadas. Este estudo foi conduzido para avaliar o efeito antiinflamatório da lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada no endométrio. Trinta e três éguas com baixo escore reprodutivo foram submetidas aos exames de citologia e histologia endometrial, previamente e três dias após os tratamentos que consistiam em lavagem uterina com solução fisiológica (n=10) como tratamento controle (TC) ou com solução fisiológica ozonizada (n=23) (TO). O grau de inflamação foi determinado pela alteração na contagem de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs). Comparando-se os dados obtidos nos exames de citologia endometrial pré e pós tratamento, não houve diferença entre os tratamentos ($p=0,3301$), no tratamento TC 50% dos animais apresentaram melhora no quadro e no TO 47,83%. Entretanto, de acordo com a avaliação histológica, constatou-se que as éguas tratadas com solução salina ozonizada obtiveram diminuição ($p<0,0001$) da contagem média de PMNs ($1,16 \pm 0,45$) quando comparadas com as éguas que receberam TC ($3,54 \pm 1,29$). Portanto, esta modalidade de tratamento pode ser utilizada em animais portadores de endometrite clínica e subclínica, e na rotina de doadoras de embrião susceptíveis a endometrite pós cobertura persistente, diminuindo assim o uso de antimicrobianos.

Palavras-chave: Endometrites. Tratamento. Ozonioterapia.

ABSTRACT

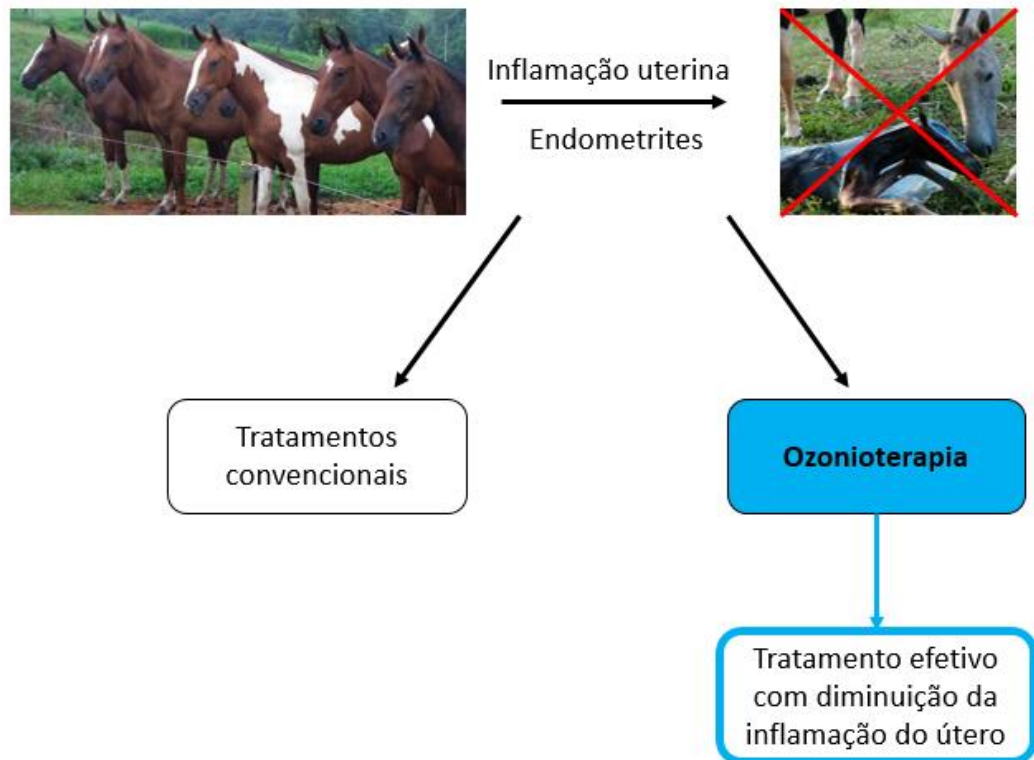
In view of the prevalence and importance of endometritis in equine breeding systems, the alternatives for treating this pathology are widely studied. This study was conducted to evaluate the anti-inflammatory effect of uterine lavage with ozonized saline solution on the endometrium. Thirty-three mares with low reproductive score were submitted to cytology and endometrial histology exams, previously and three days after treatments that consisted of uterine lavage with saline solution (n = 10) as a control treatment (TC) or with ozonized saline solution (n = 23) (TO). The degree of inflammation was determined by the change in the count of polymorphonuclear neutrophils (PMNs). Comparing the data obtained in the endometrial cytology exams before and after treatment, there was no difference between treatments (p = 0.3301), in the TC treatment 50% of the animals showed improvement in the condition and in the TO 47.83%. However, according to the histological evaluation, it was found that the mares treated with ozonated saline obtained a decrease (p <0.0001) in the mean PMN count (1.16 ± 0.45) when compared to the mares that received CT (3.54 ± 1.29). In conclusion, this treatment modality can be used in animals with clinical and subclinical endometritis, and in the routine of embryo donors susceptible to persistent mating induced endometritis, decreasing the use of antimicrobials.

Keywords: Endometritis. Treatment. Ozone therapy.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO DESCRITIVO

Elaborado por Giovanna Santesso Takakura e orientado por José Camisão de Souza

Para que se tenha êxito em produção de cavalos é necessário que as matrizes tenham boa fertilidade, que é a principal característica fisiológica sob o ponto de vista econômico. Várias fatores podem afetar a fertilidade: sazonalidade, genética, nutrição, manejo, sanidade geral e reprodutiva. Entre as patologias reprodutivas que acometem éguas, a endometrite é a que ocorre com maior frequência e tem forte impacto negativo sobre os índices reprodutivos de um criatório. Devido à alta prevalência e importância das endometrites nos sistemas de produção de equinos, as alternativas para tratamento desta patologia são muito estudadas. Na medicina integrativa, a ozonioterapia tem sido utilizada há mais de um século e número de estudos que demonstram a eficiência dos tratamentos utilizando ozônio tem aumentado nos últimos anos. A pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a eficiência do tratamento em éguas de baixo escore reprodutivo com lavagem uterina utilizando soro ozonizado. As éguas tratadas com ozonioterapia obtiveram diminuição da inflamação uterina demonstrando a possibilidade de se utilizar esta modalidade de tratamento para endometrites.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coletor comercial tipo escova citológica utilizado para exame de citologia endometrial.	35
Figura 2 - Coleta de material e confecção da lâmina para exame de citologia endometrial. ...	36
Figura 3 - Presença de PMNs em citologia endometrial. Grau moderado de acometimento (A) aumento de 1000X e grau intenso (B) aumento de 400X.....	37
Figura 4 - Pinça e camisa sanitária utilizadas para colher fragmento endometrial para histologia.	38
Figura 5 - Corte histológico do endométrio com presença de PMNs (setas amarelas) no estrato compacto aumento de 1000X.	38
Figura 6 - Preparo da solução ozonizada e sistema para infusão uterina.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contingência das frequências observadas no exame citológico após os tratamentos	42
Tabela 2 - Média das contagens de PMNs na histologia endometrial antes e depois dos tratamentos	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. Endometrites	14
2.1.1. Fisiopatologia e Mecanismos de Defesa Uterinos	15
2.1.2. Agentes Causadores de Endometrites	19
2.1.3. Diagnóstico	21
2.1.3.1. Citologia Endometrial	21
2.1.3.2. Cultura Microbiológica Uterina	24
2.1.3.3. Histologia Endometrial	24
2.1.3.4. Cultura de Lavados Uterinos	26
2.1.4. Tratamentos	26
2.2. Ozônio	29
3. MATERIAL E METÓDOS	34
3.1. Período e Localização Experimental	34
3.2. Animais	34
3.3. Tratamentos	34
3.4. Coleta de Para Exames Laboratoriais	35
3.5. Preparo da Solução Fisiológica Ozonizada.	39
3.6. Lavagens Uterinas.....	39
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Para que se tenha êxito em produção de cavalos é necessário que as matrizes tenham boa fertilidade, que é a principal característica fisiológica sob o ponto de vista econômico. Vários fatores podem afetar a fertilidade: sazonalidade, genética, nutrição, manejo, sanidade geral e reprodutiva. Entre as patologias reprodutivas que acometem éguas, a endometrite é a que ocorre com maior frequência e tem forte impacto negativo sobre os índices reprodutivos de um criatório. O fato de uma reprodutora não ser capaz de gerar descendentes é oneroso e frustrante para os criadores, em razão das perdas na linha de desenvolvimento genético do sistema produtivo.

Endometrite é a inflamação aguda, crônica ou degenerativa do endométrio uterino, podendo estar associada à infecção bacteriana ou fúngica. Devido à alta prevalência e importância das endometrites nos sistemas de produção de equinos, as alternativas para tratamento desta patologia são muito estudadas. Para tratar o processo patológico a literatura descreve a administração de antifúngicos e antibióticos administrados por via tópica e parenteral, conforme a natureza do agente causador, como também associação à terapias alternativas como administração de mucolíticos, compostos quelantes, antiinflamatórios esteroides e não esteroides, plasma rico em plaquetas autólogo, acupuntura e ozonioterapia.

Atualmente, existe a preocupação mundial com a redução da utilização de antibióticos e busca de protocolos alternativos para tratamento de afecções, estimulando e favorecendo condições para que o próprio organismo consiga debelar o agente. Desta forma, a utilização de antibióticos ficaria restrita apenas às situações de extrema necessidade.

Na medicina integrativa, a ozonioterapia tem sido utilizada há mais de um século, com relatos de sucesso no tratamento de feridos durante a primeira guerra mundial (1914-1918). O número de estudos e publicações científicas que demonstram a eficiência dos tratamentos utilizando ozônio em diversas patologias nas mais variadas espécies tem aumentado nos últimos anos. Juntamente com a medicina humana, as pesquisas na medicina veterinária são crescentes. Na área de reprodução animal alguns estudos foram realizados em bovinocultura e caprinocultura leiteira sendo reportado resultados superiores ou similares aos tratamentos convencionais utilizando antibióticos. Na reprodução equina existem relatos positivos da utilização da ozonioterapia em éguas com falha reprodutiva, entretanto, sem avaliação criteriosa sobre o efeito desta modalidade de tratamento no endométrio e componentes do sistema imune de defesa uterino.

A ozonioterapia pode reduzir a necessidade de administração de antimicrobianos, a baixíssimo custo, sem liberação de resíduos e contaminação do meio ambiente. Visando esses benefícios, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada sobre o infiltrado inflamatório no endométrio de éguas diagnosticadas positivas para endometrite utilizando exames de citologia e histopatologia endometriais

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Endometrites

Endometrite é a inflamação aguda, crônica ou degenerativa do endométrio uterino, podendo estar associada à infecção bacteriana ou fúngica (LeBLANC e CAUSEY, 2009). O útero é o órgão que recebe e implanta o zigoto, estabelece relações vasculares e acomoda o feto durante todo o período gestacional. Processos inflamatórios do útero constituem um dos principais fatores limitantes de fertilidade nas fêmeas domésticas (OVERBECK et al., 2011; RASMUSSEN et al., 2015).

Historicamente, estudos acerca da resposta inflamatória uterina de éguas, se iniciaram em 1969 quando Hughs e Loy descreveram que éguas sem problemas reprodutivos, em estro, eram capazes de debelar a inflamação após inoculação intrauterina de colônias de *Streptococcus equi* e restabelecer a homeostase em poucas horas. Em contraste, éguas com falha em conceber e múltíparas, desenvolviam prolongada resposta inflamatória deixando o útero com aspecto repleto e espessado à palpação retal. Baseado nestes achados, as éguas foram classificadas em susceptíveis ou resistentes às endometrites (HUGHES e LOY, 1969).

O útero das éguas é exposto a microrganismos durante o coito ou inseminação artificial e a deposição do sêmen de forma intrauterina induz resposta inflamatória fisiológica e transitória conhecida como endometrite pós cobertura (KOTILAINEN, 1994; TROEDSSON, 2000). Após o contato do sêmen com o endométrio, é iniciado um processo inflamatório fisiológico transitório caracterizado pelo rápido influxo de neutrófilos para o lúmen uterino (KATILA, 2012). O intuito desta resposta é eliminar o excesso de espermatozoides, plasma seminal e contaminantes antes que o embrião adentre o útero aos 5,5 dias após a ovulação, aproximadamente (LeBLANC e CAUSEY, 2009). Éguas normais conseguem debelar a inflamação em 24 a 36 horas após a cobertura (KATILA, 1995) e nas susceptíveis a inflamação persiste por mais de cinco dias após a inseminação (CAUSEY, 2006). Quando ocorre falha no sistema de defesa uterino a inflamação torna hostil o ambiente uterino, inviabilizando a gestação (LEBLANC, 2003).

A endometrite é apontada como a maior causa de falha reprodutiva determinando perdas no sistema de reprodução de equinos (BRINSKO et al., 2011; FERRIS, 2017b; HUGHES e LOY, 1975; PAPA et al., 1998; WOODS et al., 1985) sendo que a prevalência pode variar entre 25 a 60% em éguas que falham em conceber (OVERBECK et al., 2011). Falha em conceber, perda embrionária precoce, abortos, placentites, nascimento de potros em sepsis, metrites pós

parto e dificuldade de emprenhar após a parição, são perdas econômicas decorrentes desta patologia (LeBLANC e CAUSEY, 2009).

Papa e colaboradores (1998) acompanharam 128 éguas desde a cobertura até 30 dias de gestação, avaliando as éguas nas quais houve perda embrionária. Neste estudo, a taxa de perda embrionária entre 10 e 30 dias foi de 13,28%. A disfunção primária do corpo lúteo foi excluída como causa de morte embrionária, já que as concentrações séricas de progesterona estavam dentro do esperado. De acordo com exames citopatológicos, microbiológicos e histopatológicos, nove entre as dezessete éguas que perderam seus embriões apresentaram inflamação aguda ou crônica; duas apresentaram fibrose periglandular e seis apresentaram ambas alterações. Concluíram, portanto, que processos inflamatórios envolvendo o endométrio seriam a principal causa de morte embrionária na espécie equina (PAPA et al., 1998). Dlugolecka e colaboradores (2019) também obtiveram dosagens de progesterona sérica similar em éguas com perda embrionária precoce quando comparadas ao grupo controle sem perda embrionária (DLUGOLECKA et al. 2019).

2.1.1. Fisiopatologia e Mecanismos de Defesa Uterinos

Em éguas, os espermatozoides são depositados diretamente no útero e transportados rapidamente ao oviduto, entretanto, apenas uma pequena fração de gametas atinge o sítio de fertilização no oviduto. Bactérias também adentram o trato reprodutivo no momento da cópula. A maior parte do ejaculado e microrganismos contaminantes permanecem no útero, sendo eliminados por contrações uterinas e resposta inflamatória aguda. Éguas que conseguem debelar a inflamação e microrganismos utilizando os seus próprios mecanismos de defesa, reestabelecem a homeostase uterina em 24 a 36 hora para receber o embrião e são consideradas resistentes. Por outro lado, as éguas que possuem falhas na defesa uterina e não conseguem debelar os agentes infecciosos, são consideradas susceptíveis à endometrite sofrem sérias injúrias no endométrio, podendo impedir a sobrevivência do embrião (LeBLANC, 2003).

As éguas possuem três principais mecanismos de defesa para prevenir infecções uterinas: barreiras físicas do trato reprodutivo, o sistema imune e o sistema de depuração mecânica (LeBLANC, 2003).

A vulva, o esfíncter vestibulo-vaginal e a cérvix compõem as barreiras físicas preventivas contra a entrada de contaminantes como fezes, ar, urina e microrganismos no útero (FERRIS, 2017a). Qualquer alteração conformacional faz aumentar a probabilidade da entrada

de bactérias resultando, conseqüentemente, na queda das taxas de prenhez (RICKETTIS e BARRELET, 2001) e, de forma ascendente, placentite e aborto (BRADECAMP, 2011).

Baixo escore corporal, partições consecutivas, senelidade ou predisposição conformacional genética causam aumento da inclinação cranial da vulva em relação ao perieno, que dificulta a drenagem e favorece a entrada de fezes na vagina, levando à quedas das taxas de prenhez (PASCOE, 1979). Existe alta correlação entre a conformação vulvar e sanidade uterina, a deficiência na coaptação dos lábios vulvares predispõe à inflamação do endométrio (HEMBERG et al., 2005).

A cérvix, estrutura muscular que se projeta caudalmente na extremidade cranial da vagina. É a barreira física entre a vagina e o útero, se relaxa próximo do momento da ovulação e se fecha gradualmente após a ovulação. Durante o estro a cérvix sofre importantes alterações como relaxamento, edema e aumento da flexibilidade para aumentar o canal de drenagem (LeBLANC e CAUSEY, 2009) e o funcionamento adequado permite a drenagem de debris inflamatórios para fora do útero. Alterações conformacionais adquiridas ao longo da vida reprodutiva, como fibroses e divertículos, também impedem o adequado relaxamento e fechamento da cérvix. Abertura insuficiente ou fechamento precoce da cérvix podem ser causas de endometrite (LeBLANC, 2003).

Em situações nas quais o útero é invadido, o sistema imune inato é ativado. Moléculas comumente encontradas na superfície de microrganismos, constituem Padrões Moleculares associados a Patógenos (PAMPs) que ao se ligarem às imunoglobulinas, principalmente IgG e IgM, ativam o sistema complemento pela via clássica através de C3 e C5 (TROEDSSON, 1997). A ativação da cascata do sistema complemento estimula a formação de leucotrienos, prostaglandina E, prostaglandina F₂ α e outros derivados do ácido araquidônico que atuam como agentes de quimiotaxia para neutrófilos (PYCOCK e ALLEN, 1990). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, altamente sensíveis a agentes quimiotáticos como os produtos da clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e exercem importante papel nas fases precoces das reações inflamatórias. A fagocitose do agente invasor se inicia após a ligação do patógeno ao fagócito, o qual é internalizado e destruído no fagolisossomo (CRUVINEL et al., 2010).

Assim como as bactérias, os espermatozóides também são considerados causadores de inflamação que ocorre após a cobertura, quanto maior o número de espermatozoides mais intensa é a resposta leucocitária (FIALA et al., 2007; KOTILAINEN et al., 1994; GOMES et al., 2019). O plasma seminal exerce importante efeito modulatório desta resposta, contribuindo para o

transporte de espermatozoides viáveis sem suprimir a ligação dos neutrófilos aos espermatozoides não viáveis e bactérias (TROEDSSON et al., 2005).

A expressão de RNA mensageiro (mRNA) para citocinas no endométrio 24 horas após a inseminação artificial em éguas susceptíveis e resistentes foi investigada (FUMUSO et al., 2003). Neste estudo foi detectado aumento das citocinas pró-inflamatórias Interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e fator de necrose tumoral em todas as éguas, entretanto, identificou-se que nas éguas susceptíveis, o nível basal de expressão de mRNA para as citocinas citadas era mais elevado quando comparado aos níveis das resistentes.

Em 2006, o mesmo grupo de pesquisadores verificou em éguas susceptíveis, aumento da expressão de mRNA para IL-8, que possui função quimiotática para neutrófilos e diminuição da expressão de IL-10, que imunomodula a resposta inflamatória para controlar danos teciduais (FUMOSO et al., 2006).

Woodward e colegas (2013) descreveram aumento significativo na transcrição e liberação de IL-6, citocina pró-inflamatória que modula a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, nas primeiras 6 horas pós inseminação em éguas resistentes. Neste mesmo estudo, foi detectado aumento significativo de IL-10, citocina anti-inflamatória, em éguas resistentes 6 horas após a inseminação, sugerindo haver um delicado balanço para transcrição coordenada entre citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de defesa do útero (WOODWARD et al., 2013).

A capacidade de drenagem para limpeza uterina é apontada como um fator crítico na defesa contra a persistência do processo inflamatório. Algumas éguas desenvolvem processos degenerativos ou alterações anatômicas que interferem na drenagem. Parições subsequentes, má conformação perineal, incompetência do esfíncter vestibulo vaginal, alongamento do canal vaginal, incompetência cervical, útero penduloso, fibrose periglandular, degeneração vascular, linfangiectasia e aparato mucociliar comprometido são causas de drenagem ineficiente (EVANS et al., 1987). Allen e Pycock (1990) também verificaram haver diminuição da contratilidade em animais susceptíveis às endometrites e sugeriram que o acúmulo de secreção poderia favorecer o desenvolvimento de microrganismos oportunistas, agravando o quadro patológico.

O padrão de contração da musculatura uterina também influencia diretamente no processo de drenagem. A ativação do sistema complemento e liberação de prostaglandina F 2α estimulam a contração miométrial que, em conjunto com o aparato mucociliar, promovem a drenagem do conteúdo inflamatório para fora do útero (TROEDSSON, 1999). A atividade mioelétrica uterina é marcadamente menor e as contrações são menos intensas em éguas

susceptíveis. Em éguas resistentes, as contrações uterinas se iniciam imediatamente após a inoculação de bactérias e se mantêm ativas por 24 horas. Éguas susceptíveis, em contrapartida, iniciam as contrações uterinas somente 4 horas após a inoculação e após 9 horas a atividade diminui, retornando a níveis basais (TROEDSSON et al., 1993).

O aumento da produção de óxido nítrico (NO) pelo endométrio de éguas susceptíveis após a inseminação, também é descrito como causa de baixa atividade contrátil do endométrio (ALGHAMDI et al., 2005). O processo inflamatório e a presença de microrganismos ativam os macrófagos a produzirem NO e espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas com potentes efeitos antimicrobianos (MACKAY, 2000). Porém, o NO tem um efeito inibitório, dependente da dose, na contratilidade uterina espontânea da égua, independentemente da camada muscular. Éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura exibem maior atividade total de NOs (óxido nítrico sintetase) no endométrio do que éguas resistentes. A presença de concentrações aumentadas de NO no útero de éguas suscetíveis, juntamente com a diminuição da contratilidade uterina causada pelo NO constituem um mecanismo subjacente no desenvolvimento da endometrite persistente pós-cobertura (KHAN et al. 2017; KHAN et al. 2018).

Além da diminuição da contratilidade, éguas susceptíveis exibem um padrão aberrante de contração. Enquanto em éguas resistentes o movimento de contração tem início da ponta do corno em direção à cervix, em éguas susceptíveis o movimento ocorre de forma inversa, inviabilizando a eliminação do conteúdo (REITZENSTEIN et al., 2002).

Após a ovulação, quando a cervix se fecha, o conteúdo uterino remanescente é drenado passivamente através de vasos linfáticos. A eficiência do sistema de drenagem linfática de éguas resistentes à endometrites e éguas susceptíveis foi estudada por LeBlanc e colaboradores (1995) que acompanharam a drenagem de 40 mL de tinta nanquim infundidos no útero de éguas em diestro, com a cervix fechada. Éguas resistentes absorveram toda a tinta infundida em 24 horas e apresentaram os linfonodos macroscopicamente impregnados 48 horas após. Éguas susceptíveis apresentaram acúmulo de líquido em volume superior ao infundido, em torno de 130 a 150 mL, composto por tinta, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, caracterizando resposta inflamatória intensa. Os linfonodos de éguas susceptíveis foram macroscopicamente tingidos 72 horas após a infusão. Os resultados deste estudo demonstraram que durante o diestro, os vasos linfáticos e linfonodos drenam a submucosa e o lúmen uterino das éguas de forma importante para eliminação do excesso de fluido, e que a taxa de drenagem linfática é diminuída em éguas susceptíveis comparadas às resistentes (LeBLANC et al., 1995).

Cílios e muco estão presentes em mucosas e exercem importante papel na proteção e limpeza das superfícies, como no trato respiratório, gastrointestinal e urinário. No endométrio, o epitélio mucociliar é organizado em pregas que formam canais de drenagem e se continuam com as pregas cervicais, facilitando a eliminação do muco pelo movimento dos cílios. O adequado fluxo e viscosidade do muco impede a aderência e colonização do epitélio por microorganismos (CAUSEY, 2007).

Os hormônios dominantes durante o ciclo estral também interferem na imunidade uterina. Éguas acíclicas tratadas com estrógeno foram capazes de restabelecer a homeostase uterina após a inoculação de colônias de *Streptococcus zooepidemicus*. Neste mesmo estudo, as éguas tratadas com progesterona não foram capazes de combater os agentes e grande volume de conteúdo infeccioso se acumulou no útero (EVANS et al., 1986). Sob ação da progesterona ocorre dominância do perfil TH2 no qual os linfócitos periféricos produzem um fator imunomodulatório que determina a secreção de citocinas IL-3, IL-4 e IL-10, diminui a ação das células natural killers (NK) e inibe citocinas TH1, perfil pró inflamatório, como o IFNG (SZKERES-BARTHO et al., 2005).

Qualquer distúrbio nos mecanismos de defesa pode permitir a colonização do útero por bactérias patogênicas levando à cronicidade do processo infeccioso (EVANS et al., 1987).

2.1.2. Agentes Causadores de Endometrites

Segundo Albihn e colegas (2003), a bactéria mais frequentemente associada à falha reprodutiva em éguas é a *Escherichia coli*, seguida pelo *Streptococcus beta hemolítico* como o segundo mais frequente (ALBIHN et al., 2003). Overbeck e colaboradores isolaram *Escherichia coli* em 54,5% dos casos e *Streptococcus zooepidemicus* em 45,5% (OVERBECK et al., 2011). Brito e Barth relataram que o *Streptococcus zooepidemicus* como responsável por aproximadamente 65% dos casos de endometrite, enquanto a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foram identificadas em aproximadamente 10% dos casos (BRITO e BARTH, 2003). Outras bactérias aeróbias isoladas do útero de éguas incluem *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Actinobacter spp.*, *Proteus spp.*, e *Citrobacter spp.* (TROEDSSON, 2011).

Como característica individual, cada bactéria expressa seu fator de virulência e possuem diferentes formas de evasão da resposta imune subsequente. Bactérias como *Escherichia coli* se aderem à superfície do endométrio de forma tenaz, prevenindo a remoção física e os sinais clínicos são geralmente discretos, sendo associados com repetição de cio. Já nas infecções do

endométrio causadas por *Streptococcus beta hemolítico* o agente induz a produção excessiva de muco, que interfere na capacidade fagocitária dos neutrófilos, apresentam sinais clínicos mais severos, acúmulos de líquido e corrimentos vaginais (LeBLANC e CAUSEY, 2009).

Em estudos recentes foi possível identificar que o *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* pode viver em estado de latência, sem se dividir ou propagar, em casos de endometrites subclínicas em éguas, funcionando como estratégia para evasão do sistema imune (PETERSEN et al., 2009) e que a ativação prévia destas colônias seria importante estratégia para adequado efeito dos antimicrobianos (PETERSEN et al., 2015). Além do estado de latência, foi descrito que o *S. zooepidemicus* é capaz de invadir e sobreviver no interior das células epiteliais das mucosas de equinos *in vitro*, e que este evento pode explicar como esta bactéria causa infecções recorrentes e permanentes (SKIVE et al., 2017).

A forma de vida dos agentes patogênicos também determina a persistência da infecção. São descritas duas formas de vida para bactérias, o planctônico e o de biofilm. No estado planctônico as bactérias vivem de formas isolada em suspensão e são, por este motivo, mais susceptíveis à ação do sistema imune e de antimicrobianos. Em forma de biofilm, as bactérias vivem em colônias altamente especializadas, permitindo a rápida transferência horizontal de material genético acelerando a resistência aos antibióticos e aumentando a taxa de sobrevivência. As colônias em biofilm são protegidas por matriz exopolissacarídea hidrofóbica podendo ser composta por um único tipo de microorganismo ou mistas (FERRIS, 2017a). A organização em biofilm é apontada como causa comum de persistência de infecções por determinar falha do sistema imune em combater a infecção bacteriana (COSTERTON et al., 1999). A formação do biofilm tem sido indicado como o maior desafio nos tratamentos para endometrites bacterianas em éguas (FERRIS, 2017a).

Os fungos foram o terceiro microorganismo mais encontrado em éguas com problemas de fertilidade segundo Albihn e colaboradores (2003). Fungos e leveduras como *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* são isolados em até 5% dos casos de endometrites infecciosas.

Éguas acometidas por endometrite fúngica geralmente são portadoras de alterações anatômicas predisponentes ou histórico de tratamento com antibióticos que permitem o desenvolvimento de patógenos oportunistas no trato reprodutivo. Sob ação da progesterona a habilidade de fagocitose dos neutrófilos diminui e pode ser um fator predisponente à endometrite fúngica. Outros fatores predisponentes seriam a elevada contaminação de fungos no ambiente, a presença de focos de necrose ocasionados por traumas, infecções bacterianas ou isquemia (DASCANIO et al., 2001).

2.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico acurado de endometrites em éguas é importante para prever a performance reprodutiva das progenitoras e se baseia no histórico detalhado, exame clínico geral e reprodutivo incluindo: palpação transretal e ultrassonografia do trato reprodutivo; inspeção vaginal; endoscopia uterina; e exames laboratoriais como cultura, citologia e biópsia endometrial (LIU e TROEDSSON, 2008).

Nos casos de endometrite com sinais clínicos evidentes, é possível constatar ao exame ultrassonográfico o acúmulo de líquido intrauterino, bem como as características do conteúdo através da ecogenicidade. Dobras endometriais intensas indicam edema patológico do endométrio e alta correlação com baixas taxas de prenhez (ADAMS et al., 1987). Rasmussen e colaboradores (2015) demonstraram que éguas portadoras de endometrite apresentam edema uterino exacerbado quando comparadas às éguas clinicamente normais.

Éguas que sofrem de endometrite subclínica geralmente não apresentam os sinais clínicos tipicamente associados à esta patologia, como acúmulo de fluido intrauterino ou descarga vaginal. Nestes casos, o histórico reprodutivo e exames laboratoriais são especialmente importantes (LIU e TROEDSSON, 2008).

O histórico reprodutivo de éguas portadoras de endometrite subclínica relata falha em conceber, encurtamento do período entre estros ou perda gestacional precoce (LeBLANC, 2003). Sem outros sinais clínicos evidentes, faz-se necessária a realização de exames complementares como citologia, swab e biópsia do endométrio.

2.1.3.1. Citologia Endometrial

O exame de citologia endometrial consiste em coletar células do epitélio uterino, bem como as que estejam presentes no lúmen. Esta modalidade de exame é frequentemente realizada na rotina em éguas que apresentam falha reprodutiva, sendo junto com a cultura uterina, o método mais utilizado para o diagnóstico da endometrite. A maior vantagem do exame citológico é a praticidade da obtenção das amostras, baixo custo e avaliação rápida em microscopia ótica (BUCZKOWSKA et al., 2014; CANISSO et al., 2016; KOZDROWSKI et al., 2015)

Para o exame citológico um esfregaço é confeccionado à partir de amostra colhida no útero utilizando escova própria com cerdas de nylon acoplada à extremidade de um aparelho coletor estéril para citologia. Existe um consenso entre autores afirmando que a escova de nylon é o método mais indicado para se avaliar a celularidade endometrial em relação a outras

técnicas que utilizam swab ou lavado uterino com baixo volume, por permitir coleta de amostras mais profundas em função da rigidez das cerdas (BOHN et al., 2014; CANISSO et al., 2016; COCCHIA et al., 2012; KOZDROWSKI et al., 2015). Após prévia higienização do períneo, por via vaginal, o coletor é introduzido na cervix onde é rompida a proteção plástica externa. O coletor é conduzido no sentido cranial e adentra o lúmen uterino até a extremidade cranial do corpo do útero, onde a haste é exposta através do tubo rígido do coletor, entrando em contato com endométrio. Movimentos rotatórios são realizados para, por meio de fricção, obter-se o material. Posteriormente, traciona-se caudalmente a haste interna para o interior do tubo e retira-se o conjunto protegido das células cervicais e vaginais. O esfregaço é obtido rotacionando-se a escova sobre uma lâmina de microscopia. Esta forma de obtenção é denominado método de colheita rápida (KOZDROWSKI et al., 2015).

Após fixação e coloração, procede-se a avaliação ao microscópio óptico para identificar e quantificar a presença de neutrófilos, células inflamatórias polimorfonucleares (PMN). Os neutrófilos constituem a população mais abundante de glóbulos brancos sanguíneos circulantes. Durante processo inflamatório, células do sistema imune inato são atraídas para o local da injúria e são ativadas para destruir e eliminar os agentes invasores. Desta forma, a presença maciça de leucócitos determina a resposta imune a um agente agressor em determinado tecido (ABBAS et al., 2015).

A porcentagem mínima de PMN que determina a presença e gravidade do processo inflamatório ainda difere entre estudos. Em estro, uma proporção de neutrófilos pode ser considerada normal, visto que sob a ação do estrógeno ocorre aumento da vascularização do endométrio e edema que favorece a migração destas células de defesa para a superfície do endométrio. Não há consenso sobre o valor fisiológico de PMNs durante a fase de estro, proporções de neutrófilos entre 1% (AMORIM et al., 2016) e de 3% (COUTO e HUGHES, 1984; KOZDROWSKI et al., 2015) podem ser consideradas normais.

Realizando-se a avaliação em alta potência dois métodos de contagem são propostos na literatura: (1) a proporção de leucócitos polimorfonucleares (PMN) em relação às células endometriais expressa em porcentagem (%) sem levar em consideração o número de campos avaliados (COUTO e HUGHES, 1984; NIELSEN, 2005) ou (2) a presença de PMN por campo de avaliação (RIDDLE, 2007).

Contando-se de 200 a 400 células a proporção de PMN identificada e expressa em valores relativos (%) por meio do qual é estabelecido o grau de inflamação endometrial. Couto e Hugues (1884), determinaram que a proporção de PMN (%) estaria relacionada ao grau de inflamação da seguinte forma: 0 a 3 – normal no estro; >3 a 10 – endometrite leve; >10 a 15 –

endometrite leve a moderada; >15 a 30 – endometrite moderada; >30 a 50 – endometrite moderada a severa; >50 a 75 – endometrite severa; >75 – endometrite muito severa. Recentemente, foi proposto que devem ser consideradas positivas amostras nas quais as células PMN representem mais de 2% do total de células endometriais (OVERBECK et al., 2011).

RIDDLE et al. (2007) determinaram que dez campos de alta potência (em aumento de 400 vezes) de cada esfregaço fossem escolhidos aleatoriamente e avaliados, sendo o número médio de PMNs encontrado entre eles o resultado, que serviria como avaliação da gravidade da inflamação no endométrio da seguinte forma: 0 a 2 sem inflamação; 2 a 5 inflamação moderada; maior que 5 inflamação grave.

KOZDROWSKI et al. (2015), comparando os dois critérios de avaliação, porcentagem de PMN e o número de PMN em campos de alta potência, encontraram um diagnóstico mais sensível de endometrite nos esfregaços avaliados de acordo com a porcentagem de PMNs.

Resultado positivo somente no exame citológico, somente no bacteriológico ou nos dois exames são capazes de indicar, de forma igual, as chances da égua levar a gestação à termo (DAVIS MOREL et al., 2013).

Falsos negativos na citologia podem ocorrer por falha no procedimento de obtenção da amostra ou por atuação dos mecanismos de defesa de algumas bactérias anaeróbias que aumentam a viscosidade do muco como forma de escape da defesa celular. Overbeck e colegas (2011) obtiveram 6 amostras de citologia negativa em éguas com endometrites causada por *E. coli*. Outro estudo já havia documentado que em apenas 12% das culturas positivas para anaeróbios as evidências citológicas de inflamação estavam presentes (RICKETTS e MACKINTOSH, 1987). Estudo comparando sinais clínicos, análise de lavado uterino de baixo volume, citologia, cultura e biopsia endometrial e combinações para diagnosticar endometrites em éguas, também apresentou baixa sensibilidade do exame citológico (DIEL DE AMORIM et al., 2016). Nielsen e colegas (2012), afirmaram haver baixa correlação entre a presença de PMNs na citologia e na avaliação histológica. Neste estudo, 53% das éguas que obtiveram ausência de neutrófilos no esfregaço endometrial apresentaram PMNs presentes no endométrio à avaliação histológica e em 31% das citologias positivas os PMNs não estavam presentes na histologia. Rua e colaboradores (2018) avaliando 51 animais com histórico de infertilidade obtiveram 51% dos animais com sinais de inflamação no endométrio sendo que apenas 25,5% dos animais foram positivos no exame citológico.

2.1.3.2. Cultura Microbiológica Uterina

Na tentativa de isolar o agente causador, swab endometrial pode ser realizado e enviado para cultura em laboratório. O swab é colhido por atrito ao endométrio e semeado em ágar sangue, geralmente, e 24 horas após incubação a 37°C o crescimento é avaliado. Apenas o crescimento substancial de determinado agente é considerado como positivo, o crescimento de colônias mistas e esparsas são consideradas como contaminantes (NIELSEN, 2005). A cultura microbiológica uterina permite a identificação do microrganismo causador e a realização do teste de susceptibilidade ao antimicrobiano, sendo este um ponto positivo da sua utilização. Porém, como em qualquer teste de diagnóstico, falsos positivos e falsos negativos podem resultar de técnicas de amostragem deficientes (CANISSO et al., 2016).

Overbeck e colaboradores (2011) afirmaram não haver correlação entre exame citológico e bacteriológico. Neste estudo apenas 18,2% das éguas que obtiveram citologia positiva foram positivas no bacteriológico e isto pode ser explicado pelo fato do swab não atingir diretamente o foco da infecção (OVERBECK et al., 2011). Buczkowska e colaboradores (2014) recomendam o uso da citologia uterina, juntamente com a cultura endometrial, para diagnóstico de endometrites subclínica. Quando os resultados do exame citológico e bacteriológico são inconclusivos, o estudo histológico do endométrio se faz necessário (LeBLANC e CAUSEY, 2009).

2.1.3.3. Histologia Endometrial

O estudo da arquitetura do endométrio é uma valiosa ferramenta para avaliar a saúde uterina e revela dados impossíveis de serem diagnosticados através de exame clínico (DLUGOLECKA et al., 2019). Os primeiros relatos foram de biopsias uterinas em pôneis por Hammond e em éguas em estro por Andrews em 1941. Anos mais tarde, em 1966, Tobler descreve a biopsia como ferramenta para diagnóstica de alterações no útero (SNIDER et al., 2011). Com o refinamento da técnica, o Dr. Robert M. Kenney descreveu as modificações estruturais do endométrio conforme a fase do ciclo estral, alterações patológicas (KENNEY, 1975) e correlacionou com a probabilidade de levar a gestação a termo (KENNEY, 1978). Recentemente, Buczkowska et al. (2016) verificou que alterações degenerativas do endométrio predisõem o desenvolvimento de processos inflamatórios. O exame histológico a partir de biopsia endometrial não tem sido utilizado rotineiramente por ser considerado menos prático de ser realizado e pelo fato do resultado ser mais demorado (OVERBECK et al., 2011; CANISSO et al., 2016)

Utilizando pinça própria para coleta de biópsia endometrial, um pequeno fragmento do endométrio é colhido, fixado em formol a 10%, o corte histológico preparado e corado com hematoxilina eosina. Ao microscópio óptico é possível avaliar o grau de fibrose, inflamação, agentes infecciosos e má diferenciação endometrial (SNIDER, 2011).

Alguns autores preconizam que apenas uma amostra de biópsia para avaliação histológica não é totalmente representativa de todo o útero (DYBDAL et al., 1991; FIALA et al., 2010), podendo ser avaliada a necessidade da coleta de múltiplas amostras em algumas éguas (MCCUE, 2008). Em contraste com estas observações, OVERBECK et al. (2013) não encontraram diferenças significativas nos números de PMNs em material de biópsia coletado post-mortem de diferentes localizações do útero equino.

Neutrófilos geralmente estão presentes dentro dos vasos e na superfície, a presença nos tecidos é compatível com inflamação. Poucos e dispersos linfócitos podem estar presentes no endométrio saudável, entretanto, em processo inflamatório crônico ocorre aumento do número ou agrupamentos. A presença de macrófagos aumentada também indica cronicidade de inflamação. Macrófagos contendo hemossiderina, chamados de siderócitos, podem ser encontrados após hemorragias. Plasmócitos não são encontradas no endométrio saudável e a presença deles indica processo crônico no qual uma imunoglobulina específica está sendo produzida. Eosinófilos podem indicar processo inflamatório específico, a presença deles é comum em infecções fúngicas e indica necessidade de isolamento de agentes fúngicos (KENNEY, 1978).

De acordo com SCHOON et al. (1992), a presença de neutrófilos em proestro ou estro não indica inflamação, sendo que em diestro indica. LEBLANC et al. (2007) e BUCZKOWSKA et al. (2014) definiram o limiar de inflamação em biópsias endometriais para 3 ou mais PMNs em 5 campos de visualização. De forma mais rigorosa, Nilsen (2005) e KOZDROWSKI et al. (2015) consideram que infiltrado no epitélio luminal endometrial e no estrato por um ou mais PMNs, avaliando cinco campos de alta potência, é considerada evidência de endometrite.

Nielsen (2005) comparou e avaliou swabs e biópsias endometriais, realizando citologias e culturas para diagnóstico de endometrites em éguas. Os resultados sugeriram que a biópsia endometrial é o mais sensível e específico método para o diagnóstico (NIELSEN, 2005). Estudando o endométrio de éguas que apresentaram perda embrionária precoce, Dlugolecka e colegas também afirmaram ser a histopatologia o exame mais preciso para avaliação do endométrio (DLUGOLECKA et al., 2019). A presença de PMNs no epitélio do lúmen endometrial e no extrato compacto do endométrio é considerado por muitos autores como sendo

o mais eficiente diagnóstico de endometrite em éguas, entretanto raramente indica o agente causador e tão pouco auxilia na escolha do protocolo de tratamento a ser utilizado (LeBLANC et al, 2007; NIELSEN et al, 2011; OVERBACK et al, 2011; RUA et al., 2018; DLUGOLECKA et al, 2019). A presença de PMNs no endométrio reduz as chances das éguas em se tornarem prenhes quando comparadas com éguas sem a presença de PMNs no endométrio (NIELSEN et al, 2011).

2.1.3.4. Cultura de Lavados Uterinos

Com intuito de colher amostras representativas para exames de cultura e citologia uterinas, BALL e colaboradores (1988) descreveram a técnica de avaliação do líquido recuperado por lavado uterino de baixo volume (LBV). Através de uma sonda estéril um pequeno volume de solução estéril (60 a 150 mL) é introduzido no útero e distribuído pelos cornos através de massagem transretal. O efluente obtido após a drenagem pode ser encaminhado para cultura microbiológica e centrifugado para avaliação citológica (BALL et al., 1988; LEBLANC et al., 2007).

Os debris retidos no filtro durante a drenagem da solução utilizada na coleta de embriões também podem ser utilizados para cultura de microrganismos e identificação de células inflamatórias oriundas do útero de doadoras de embriões com suspeita de endometrite subclínica (PÉREZ-MARIN et al., 2018).

2.1.4. Tratamentos

Diante da prevalência e importância das endometrites nos sistemas de reprodução de equinos, as alternativas para tratamento desta patologia são muito estudadas (SCOGGIN, 2016). Tratar endometrites é desafiador e compreende identificar a causa primária, conhecer profundamente a fisiopatologia dos agentes causadores para selecionar o protocolo de tratamento (FERRIS, 2017b).

A correção cirúrgica das alterações conformacionais de vulva e vestíbulo vaginal deve ser realizada caso sejam a causa primária da contaminação uterina. As vulvoplastias impedem a recidiva e aumentam as taxas de prenhez nos animais submetidos a tratamento (CASLICK, 1937; INOUE e SEKIGUCHI, 2017; PAPA et al, 2014;)

As múltiplas opções para tratar endometrites infecciosas visam a eliminação do agente causador e a expulsão dos debris inflamatórios. Para debelar o processo patológico a literatura descreve a administração de antibióticos e antifúngicos administrados por via tópica e

parenteral, conforme a natureza do agente causador (FERRIS, 2017b; SCOFIELD et al, 2013) e também associação à terapias alternativas como administração de mucolíticos, compostos quelantes, antiinflamatórios esteroides e não esteroides, plasma rico em plaquetas autólogo, acupuntura (BUCZKOWSKA et al, 2015; GORES-LINDHOLM et al, 2013; SCOGGIN, 2016) e lavagens uterinas com solução ozonizada (HEREDIA, 2013).

A utilização de infusões uterinas com antibióticos é benéfica em casos de endometrite bacteriana confirmado, entretanto é muito utilizado de forma empírica como uma única lavagem pós ovulação para tratar éguas (LIU, 2011). Tratamentos com antibióticos realizados de forma inadequada podem induzir a processo crônico com bactérias resistentes, devido às baixas concentrações que o fármaco pode atingir no endométrio (GONZÁLEZ et al, 2010).

Lavagens uterinas são descritas na literatura e frequentemente utilizadas de forma estratégica como tratamento pós cobertura em éguas susceptíveis à endometrite. Soluções antisépticas incluindo iodo povidine, clorexidine, salina hipertônica e peróxido de hidrogênio diluídas em Ringer lactato ou solução salina (0,9%) podem ser infundidas no útero e drenadas posteriormente (BUCZKOWSKA et al, 2015; SCOGGIN, 2016). Entretanto, Troedsson (2011) afirma que essas soluções são fortemente irritantes e não devem ser utilizadas na rotina por causarem danos ao endométrio.

O peróxido de hidrogênio é há muitos anos conhecido por seu efeito antisséptico, exerce efeito antimicrobiano de amplo espectro contra bactérias, fungos, vírus, leveduras e esporos. Para tratamento de endometrite em éguas é recomendado a realização de lavagens uterinas com solução de Ringer lactato acrescido de solução de H₂O₂ a 3% (LeBLANC e McKINNON, 2011). Apesar do peróxido de hidrogênio apresentar excelente ação bactericida *in vitro*, atuando inclusive no biofilm (FERRIS, 2014), Hasset e colaboradores (1999) mencionam que o efeito *in vivo* pode ser limitado pela capacidade das células de neutralizar os efeitos antimicrobianos do peróxido de hidrogênio através da catalase, enzima antioxidante.

A infusão intrauterina de querosene também é descrita na literatura com resultados positivos (BRACHER et al, 1991) embora existam ressalvas sobre os efeitos no endométrio (BRADECAMP et al, 2014; LeBLANC e CAUSEY, 2009). Querosene é um fluido destilado do petróleo que contém hidrocarbonetos usualmente utilizado como solvente e combustível há mais de 100 anos. A utilização do querosene para tratar éguas subfêrteis foi inicialmente proposta por Bracher e colaboradores (1991) quando estes pesquisadores obtiveram altas taxas de prenhez (87,5%) em éguas tratadas no ciclo anterior à cobertura. Entretanto, a taxa de potros nascidos foi de apenas 62,5%. O mecanismo através do qual o querosene aumenta as taxas de prenhez não foi bem definido. Os autores identificaram redução de muco e exudato causado

pela destruição do epitélio glandular e, em 50% dos casos, ocorreu necrose do epitélio luminal. As prenhez positivas obtidas no ciclo posterior ao tratamento foram atribuídas à rápida capacidade de regeneração do epitélio (BRACHER et al, 1991).

Bradecamp e colaboradores (2014), documentaram através de biópsias seriadas que 24 horas após a infusão, o querosene promove diminuição significativa das células epiteliais ciliadas e que a concentração destas células retorna aos níveis normais, pré tratamento, quatro dias após. O querosene parece induzir a curetagem química do epitélio endometrial, removendo de forma efetiva debris e microorganismos proporcionando ambiente favorável ao desenvolvimento embrionário (BRADECAMP et al, 2014). Apesar do tratamento intra uterino com infusão de querosene ser considerado demasiado agressivo por grande parte dos médicos veterinários, a utilização criteriosa e apropriada pode trazer resultados satisfatórios quando outras modalidades de tratamento falharam (SCOGGIN, 2016).

A infusão intrauterina de plasma rico em plaquetas pode ser realizada pré e pós inseminação artificial para controlar a inflamação em éguas susceptíveis à endometrite pós cobertura persistente e incrementar as taxas de prenhez (SEGABINAZZI et al., 2017)

Imunomoduladores podem ser utilizados estrategicamente para reduzir a resposta neutrofílica e linfangiectasia pós inseminação em éguas susceptíveis. Dell'Aqua e colaboradores (2006) realizaram estudo administrando 0,1 mg/kg de acetato de 9-alfa-prednisolona e reportaram aumento das taxas de prenhez em éguas susceptíveis. A administração de 50 mg de dexametasona por via intramuscular antes da cobertura ou inseminação artificial também relatou resultados positivos para taxas de prenhez (BUCCA et al, 2008). O Firocoxib, anti-inflamatório não esteroidal, administrado por via oral na dose de 0,2 mg/Kg no dia da indução da ovulação, também pode ser utilizado para controlar a reação inflamatória do útero sem interferir na ovulação e na drenagem uterina (FRISO et al., 2019).

A lactoferrina recombinante humana, administrada através de infusão uterina no momento da cobertura causa redução da expressão de mRNA para a citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) 6 horas após a inseminação quando comparada à infusão de solução Ringer com Lactato (FEDORKA et al., 2016). A mesma modulação da resposta inflamatória pós cobertura ocorreu quando a infusão foi realizada 6 horas após a inseminação artificial e não foram atribuídos danos ao endométrio após o tratamento (FEDORKA et al., 2018). Entretanto, testes para avaliar o efeito sobre a fertilidade ainda devem ser realizados.

A administração de ecbólicos, ocitocina e cloprostenol, promovem contração miometrial exógena melhorando de forma significativa a depuração de fluidos uterinos inflamatórios (PYCOCK e NEWCOMB, 1996). As doses de ocitocina recomendadas variam

entre 10 a 25 UI, administradas por via endovenosa ou intramuscular, sendo que doses acima de 25 UI resultam em decréscimo das taxas de prenhez (KNUTTI et al, 2010). Entretanto, é importante ressaltar que a ocitocina pode não ser eficiente em todas as éguas que acumulam líquido intrauterino, os fatores que podem afetar a eficiência incluem baixo número de receptores endometriais, útero penduloso, cérvix fechada e doses excessivas promovendo padrão de contração inadequado (VON REITZENSTEIN et al, 2002).

Exercícios físicos, além de favorecer o bem estar do animal, podem promover melhora na circulação sanguínea e linfática do trato reprodutivo e, por fortalecimento muscular, melhorar a conformação perineal favorecendo as barreiras físicas contra a entrada de microorganismos no trato reprodutivo (SCOGGIN, 2016). Suplementação da dieta com Ômega 3 influencia na produção de citocinas, reduzindo a resposta inflamatória após inseminação (BRENDENMUEHL et al, 2014).

O processo de endometrite pós cobertura em éguas susceptíveis, quando não tratado adequadamente, pode persistir e se tornar processo patológico crônico (LeBLANC, 2010).

2.2. Ozônio

Data de 1840 a descoberta do ozônio pelo químico alemão Christian F. Schoenbein, que estudando correntes elétricas em água notou a produção de um gás de odor forte e característico ao que nomeou de “ozon”, derivado do termo grego “ozein”, aquilo que emite cheiro. Em 1857 o engenheiro e inventor Ernst Werner von Siemens construiu o primeiro gerador de ozônio na Alemanha possibilitando as primeiras experimentações terapêuticas com o gás (LUKES et al, 2005).

Os primeiros relatos de aplicação clínica do ozônio foram em soldados nos hospitais militares que recebiam feridos da Primeira Guerra Mundial. Ozônio era utilizado para descontaminação de feridas purulentas e em curativos pós operatórios (STROKER et al, 1916; STROKER et al, 1917).

A ausência de materiais adequados e resistentes à oxidação, como plásticos, para aplicação local de ozônio tornava sua utilização complicada, razão pela qual foi esquecida durante um tempo. É possível que a descoberta da penicilina, antibiótico de amplo espectro, pelo bacteriologista Alexander Fleming, em 1928 também tenha desestimulado o desenvolvimento da técnica. No final da década de 50, com o desenvolvimento de materiais plásticos e de um aparelho gerador de ozônio de uso médico criado pelo Dr. Joaquim Hänslar na Alemanha, a ozonioterapia voltou a ser aplicável e cada vez mais estudada em diversos

países do mundo incluindo Áustria, Alemanha, Suíça, Japão, Estados Unidos, Itália, Rússia, Espanha, Cuba, entre outros. Em 1986 o médico veterinário alemão Siegfried Schulz iniciou a experimentação em animais a fim de avaliar o potencial farmacológico da ozonioterapia para desenvolvimento da utilização em seres humanos e animais. Mecanismos e efeitos terapêuticos começaram a ser documentados e desde então crescem o interesse e o número de pesquisas com ozônio (RODRÍGUEZ et al., 2018).

A molécula de ozônio é composta por três átomos de oxigênio, é um alótropo triatômico do oxigênio com potencial oxidante muito maior do que a molécula diatômica. Instável em altas concentrações, as moléculas de O₃ se decompõe com facilidade em moléculas de O₂ e por isso não gera resíduos tóxicos (LUKES et al, 2005).

Nos últimos anos a ozonioterapia tem sido cada vez mais desenvolvida e difundida em razão dos vários efeitos biológicos produzidos através de suas diversas formas de aplicação. A ozonioterapia se caracteriza pela simplicidade de sua aplicação, efetividade, boa tolerância e baixa ocorrência de efeitos colaterais quando aplicada de forma correta (Viebahn-Hänsler et al, 2016).

O ozônio é uma droga com propriedades matriarcais, isto é, em contato com fluidos corporais produz mensageiros, ozonídeos com ação oxidante, que atingem a circulação sanguínea sistêmica e desencadeiam uma sequência de estímulos e efeitos farmacológicos. Estudos *in vivo* comprovaram que o ozônio, em baixas doses, ativa o fator nuclear Nrf2, responsável pela ativação da transcrição de genes para produção de enzimas antioxidantes e substâncias citoprotetoras (RE et al, 2014).

Segundo Recio del Pino et al, 1999, a ozonioterapia promove vasodilatação, por induzir liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais, altera a plasticidade das hemácias permitindo melhora na circulação periférica favorecendo a oxigenação dos tecidos, permitindo a chegada de componentes do sistema imune de defesa, nutrientes e fatores de reparação tecidual nos tecidos danificados.

Menéndez e colaboradores (2008) atribuem à ozonioterapia importante papel no tratamento de cânceres, visto que a hipóxia tumoral é reconhecida como mecanismo para resistência das células neoplásicas às drogas anti tumorais e radioterapia.

Viebahn-Hänsler e colaboradores (2016), realizaram um estudo retrospectivo de dados apresentados na literatura, totalizando 1293 pacientes que fizeram uso da ozonioterapia pelas vias sistêmicas autohemoterapia maior ou insulflação retal. Em todos os estudos houveram efeitos benéficos clínicos e farmacológicos significativos sem efeitos colaterais ou reações adversas.

O desenvolvimento de variados mecanismos de resistência contra as formas de atuação bactericida de diversos grupos químicos disponíveis atualmente incrementam as taxas de morbidade, mortalidade e custos de tratamentos (LIN et al, 2015). A resistência é a principal causa de falha em tratamentos que utilizam antibióticos e contínuo aumento da amplitude deste fenômeno estabelece sério problema terapêutico na erradicação de infecções (FRANZINI et al, 2016). A ação do ozônio, contra bactérias, vírus e fungos é fato (PÉREZ et al, 2003). O efeito oxidativo interfere na integridade da parede celular das bactérias desestabilizando os fosfolípídeos e lipoproteínas de membrada. Nos fungos o O₃ inibe a divisão celular em certos estágios e o efeito viricida é atribuído a danos ao capsídeo (ELVIS e EKTA, 2011).

Calunga et al (2012), avaliaram positivamente a ação do ozônio em diminuir o estresse oxidativo em 80% dos pacientes com osteoartrite. Houve redução da dor, diminuição do progresso da degeneração e conseqüente melhoria na qualidade de vida dos pacientes. Bocci et al (2015), afirmaram que através de complexos mecanismos ocorre a ozonioterapia tem importante atuação analgésica.

Na medicina humana o ozônio promoveu efeitos benéficos quando utilizado para tratamento de diversas enfermidades como em distúrbios nervosos (DIÁZ-SOTO et al, 2012), regeneração de nervos (OZBAY et al, 2017), em osteoartrites (ANZOLIN e BERTOL, 2018), auxiliando no tratamento de feridas contaminadas por bactérias resistentes a antibióticos (FRANZINI et al, 2016), enfermidades inflamatórias e infecciosas (VIEBAHN-HÄNSLER et al, 2016).

Na medicina veterinária crescem os estudos para quantificar e avaliar a eficiência da ozonioterapia na clínica em diversas espécies de produção ou companhia.

Em ovinos, o tratamento com ozônio e plasma rico em plaquetas ozonizado foi eficaz em substituir a antibioticoterapia em casos de pododermatite infecciosa conhecida também como footrot (SZPONDER et al, 2017).

A autohemoterapia maior ozonizada promoveu aumento de células do sistema imune na circulação periférica e aumento das concentrações séricas de IL-6 em bezerras sugerindo efeito imunoestimulatório (TERASAKI et al, 2001). Em vacas portadoras de doenças inflamatórias, a autohemoterapia maior induziu aumento significativo de células T efectoras CD4⁺ e CD8⁺ em relação ao grupo controle, sugerindo diferença na ativação da resposta imune em animais doentes (OHTSUKA et al, 2006).

Em 2015, Tsuzuki et al., publicaram estudo no qual concluíram que a autohemoterapia com ozônio contribui para melhor condicionamento físico de equinos atletas por neutralizar as

espécies reativas de oxigênio formadas em excesso nas mitocôndrias à partir do alto consumo de oxigênio durante o exercício.

O ozônio ativa monócitos e linfócitos e induzem a produção de uma gama de citocinas como as interleucinas IL-1, IL2 IL-6, interferons e TGF β (Bocci, 1992). As interleucinas IL-1 e IL-6 induzem os hepatócitos a produzir fibrinogênio, reagente de fase aguda precursor de fibrina que contribui para hemostasia e reparo tecidual. A IL-2 estimula células T a se proliferar e diferenciar em células de memória, induz a proliferação e ativação de células NK e as células B a se proliferar e produzir anticorpos. Os interferons estimulam resposta antiviral, aumentando a expressão de MHC-I e MHC-II (ABBAS, 2015). Portanto, o ozônio exerce papel imunoestimulante.

Na reprodução de bovinos diversos estudos utilizando ozonioterapia tem aumentado a eficiência reprodutiva das vacas e diminuído a utilização de antibióticos. A ozonioterapia em estágios iniciais de certas patologias reprodutivas, principalmente endometrites, evita o agravamento e a necessidade do uso de antimicrobianos (DURICIC et al, 2014; DURICIC et al 2015a). Em geral, resultados tem demonstrado que a ozonioterapia é similar, ou mais eficiente, em tratamentos reprodutivos quando comparados aos resultados dos tratamentos convencionais, sem efeitos adversos ou presença de resíduos no leite e ambiente (ZOBEL et al, 2012a; ZOBEL et al, 2012b; DURICIC et al 2015a; DURICIC et al 2015b, POLAT et al 2015; IMHOF et al 2019).

Em casos de retenção de placenta em vacas de leite, o tratamento com lavagens uterinas ozonizadas com ou sem associação à antibioticoterapia parenteral obtiveram maior sucesso quando comparados à tratamentos convencionais utilizando antibioticoterapia tópica, parenteral ou hormonal (ZOBEL et al, 2012a).

Zobel e colaboradores, 2012b, publicaram um estudo envolvendo 1219 vacas diagnosticadas com urovagina, comparando o número de inseminações artificiais necessárias para obtenção da prenhez entre tratamento utilizando lavagens uterinas com solução salina, lavagens uterina com estreptomicina e insulflação do útero com ozônio em forma de spray. Os tratamentos eram realizados previamente à inseminação artificial e o tratamento com ozônio reduziu de forma significativa o número de inseminações realizadas para se obter a prenhez quando comparado aos outros tratamentos. Imhof e colaboradores, 2019, compararam a eficiência entre infusão de ozônio em spray e infusão de cápsulas de tetraciclina intrauterinas e não houve diferença significativa demonstrando que os tratamentos com ozônio podem diminuir, de forma importante, a utilização de antimicrobianos.

Estudo comparando os resultados entre o tratamento intrauterino com ozônio e rifamicina em vacas com endometrite subclínica concluiu que os resultados de ambos tratamentos foram similares. Entretanto, os autores ressaltam a grande vantagem de não se fazer necessário o descarte do leite em tratamentos que utilizam ozônio (POLAT et al, 2015).

Em cabras com retenção placentária não houve diferença entre tratamento utilizando ozonioterapia na forma de spray intrauterino (n=21) e antibioticoterapia realizada através da administração de oxitetraciclina (n=20). Em ambos os tratamentos as cabras obtiveram diagnóstico de gestação positivo no ciclo seguinte (DURICIC et al, 2015b).

Em equinos, os efeitos do ozônio foram estudados Alves e colaboradores (2004), em lesões de reperfusão de jejuno em equinos. Segundo o estudo, foram atribuídos à ozonioterapia a vasodilatação periférica, mediada pela ação do óxido nítrico, que evitaram lesões no endotélio vascular e mucosa, favorecendo a recuperação dos pacientes.

Na medicina esportiva o efeito analgésico proporcionado por ozonioterapia intramuscular paravertebral foi comprovado no tratamento de cavalos de corrida com dores lombares recorrentes (VIGLIANI et al, 2005). Tsuzuki e colaboradores (2015), constataram aumento de produção de enzimas antioxidantes em cavalos atletas submetidos à autohemoterapia maior. O aumento da capacidade antioxidante favorece a neutralização das espécies reativas de oxigênio produzidas durante o metabolismo, minimizando danos celulares.

Em éguas, lavagens uterinas utilizando água ozonizada produziu interessantes resultados para tratamento de éguas com falha reprodutiva. No estudo, 6 éguas com histórico de falha reprodutiva engravidaram após o tratamento (HEREDIA, 2013). Montechiesi e Ignácio (2018) obtiveram sucesso ao tratar um caso de endometrite por *Pseudomonas sp.* utilizando lavagens uterinas com soro ozonizado e insuflação do útero com mistura de oxigênio ozônio.

Devido aos efeitos locais antimicrobiano e antiinflamatório do ozônio, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da lavagem uterina utilizando soro fisiológico ozonizado em éguas com baixo escore reprodutivo.

3. MATERIAL E METÓDOS

3.1. Período e Localização Experimental

O estudo foi conduzido durante a estação reprodutiva no período de abril a dezembro de 2019, quando foram realizados os tratamentos e coletadas amostras de animais alojados na Fazenda Nossa Senhora Aparecida, município de Cambuquira, estado de Minas Gerais, latitude 21° 51' 30" e longitude 45° 17' 28". As amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Patologia Animal do DMV/UFLA.

3.2. Animais

Este projeto, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA (091/18).

Foram utilizadas 33 éguas da raça Mangalarga Marchador e mestiças; matrizes, doadoras de embriões e receptoras; com idade entre 5 e 15 anos, estimada através do desgaste dentário; suspeitas de serem acometidas por endometrite subclínica por apresentar histórico de infertilidade no transcorrer da atual estação de monta e na anterior. Os animais estavam em regime semi-extensivo, em lotes de 2 a 15 animais, em pastagens de boa qualidade, recebendo silagem de milho, água em bebedouros naturais e sal mineral ad libitum. O escore de condição corporal variou entre 4 (moderadamente magro), 5 (moderado) e 6 (moderadamente obeso) de acordo com a classificação de HENNEKEET et al., 1983.

Foram incluídas no experimento éguas doadoras de embriões com 3 ou mais lavados negativos para recuperação de embriões; matrizes que apresentaram 1 ou mais diagnósticos negativos na atual estação de monta além de não confirmação de gestação na estação reprodutiva anterior; receptoras de embriões que obtiveram 2 ou mais diagnósticos negativos de gestação após transferência de embrião.

Todas as éguas foram examinadas clinicamente para descartar a possibilidade de patologia sistêmica concomitante.

3.3. Tratamentos

No total de 33 animais, 10 foram destinados a receber o tratamento controle (TC) utilizando lavagem uterina com solução fisiológica e 23 receberam o tratamento utilizando lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada (TO).

As éguas selecionadas através do histórico de infertilidade foram examinadas através de palpação retal e ultrassonografia, a coleta de amostras e tratamentos foram iniciados quando o

animal estava em fase estrogênica, ou seja, na presença de um folículo dominante e edema do endométrio. O dia da coleta das primeiras amostras, para citologia e histopatologia, e do tratamento foi denominado dia 0 (D0). No terceiro dia pós tratamento, dia 3 (D3), novas amostras para citologia e histopatologia endometrial foram colhidas.

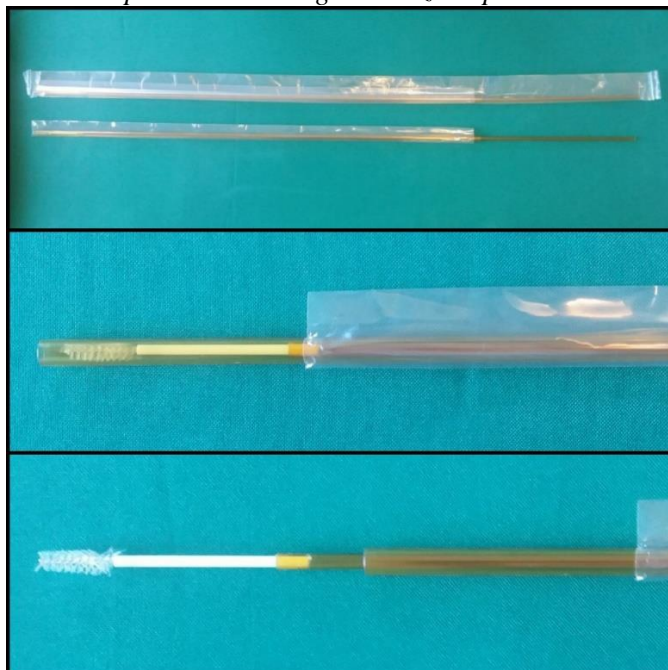
3.4. Coleta para Exames Laboratoriais

Os animais selecionados foram submetidos à colheita de amostras para citologia endometrial e exame histopatológico do endométrio imediatamente antes da realização do tratamento e no terceiro dia após a fim de se avaliar a variação da contagem de neutrófilos em função dos tratamentos. A fim de padronizar os dados obtidos para posterior análise, os tratamentos foram realizados nos animais em estro.

Para proceder a coleta de material o animal foi colocado em tronco de contenção adequado em sala de alvenaria coberta e protegida contra excesso de poeira e insetos. A cauda foi envolvida com plástico nos 30 cm próximos à base e contida lateralmente, evitando contaminação da região perineal após a antisepsia. A região perineal era higienizada por 3 vezes consecutivas através de lavagem utilizando solução degermante de clorexidina 2% e a secagem realizada com toalhas de papel descartáveis.

Foi utilizado coletor para citologia uterina descartável e estéril próprio para éguas revestido por camisa sanitária (PROVAR® - São Paulo, Brasil) (Figura 1).

Figura 1 - Coletor comercial tipo escova citológica utilizado para exame de citologia endometrial.



Fonte: Takakura, 2020.

Com a mão protegida por luva plástica de cano longo o coletor era posicionado na palma da mão e uma gota de lubrificante atóxico colocado no dorso da mão. O coletor protegido por camisa sanitária era introduzido na cérvix, via vaginal, local de rompimento da camisa sanitária. O conjunto coletor, ainda com a escova protegida no seu interior, era introduzido até o extremo cranial do corpo do útero, na região de bifurcação dos cornos, onde a extremidade da haste era exposta. Através de giros da haste, cinco para a direita e cinco para esquerda, produzia-se o atrito para colheita das células. A haste era tracionada para o interior da proteção e então retirada do útero. Para confeccionar o esfregaço a escova era deslizada levemente em movimento rotatórios pela lâmina de microscopia (Figura 2), seca ao ar e corada com Kit Panótico Rápido (Laborclin® - Paraná, Brasil).

Figura 2 - Coleta de material e confecção da lâmina para exame de citologia endometrial.

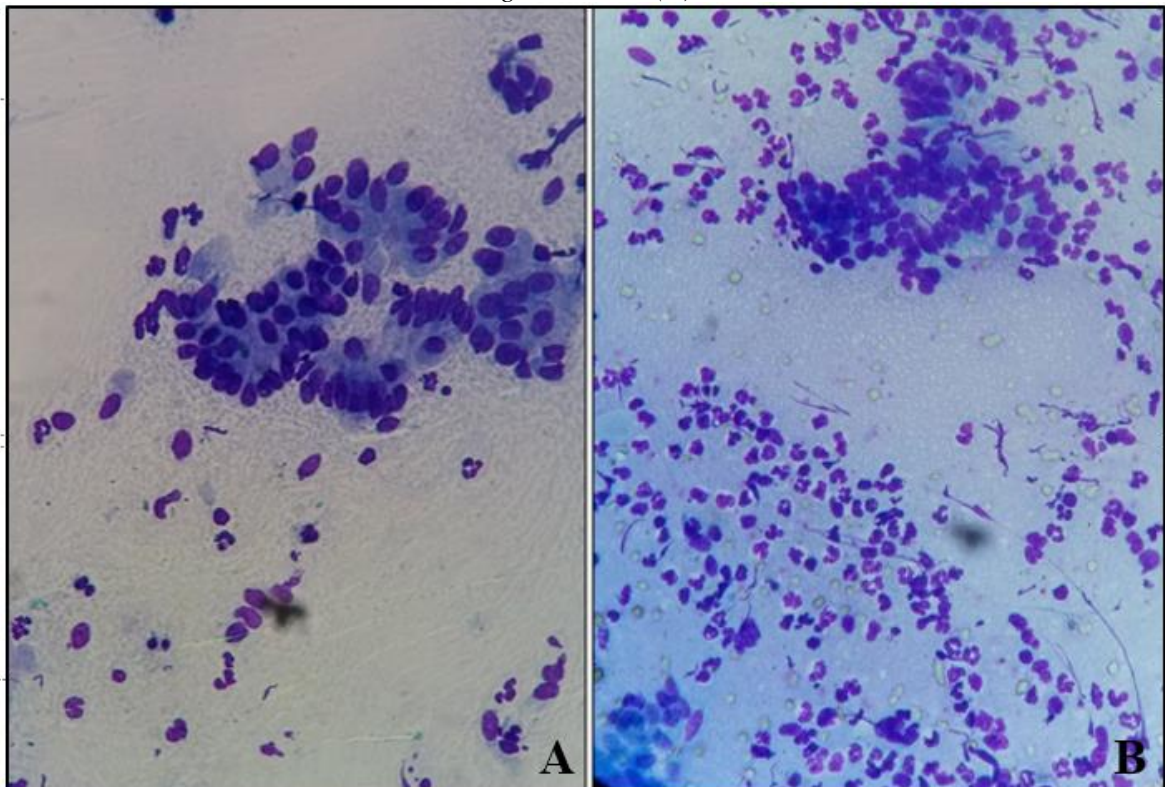


Fonte: Takakura, 2020.

Após coloração as lâminas foram avaliadas por microscopia de luz (Eclipse E200, Nikon®, Tokio, Japão) em aumento de 1000 x sob imersão em óleo, por um mesmo examinador, de forma a contabilizar a proporção de PMNs em relação a células endometriais,

sendo contabilizadas 300 células (Figura 3) sem levar em consideração o número de campos avaliados por lâmina. O resultado foi expresso em porcentagem de PMNs em relação às células endometriais, sendo classificado em: - Menor que 2%: negativo; - 2 a 5%: leve; - 5 a 30%: moderado; - Maior que 30%: intenso. A classificação foi realizada para comparar se houve melhora, agravamento ou não alteração do status do animal após os tratamentos.

Figura 3 - Presença de PMNs em citologia endometrial. Grau moderado de acometimento (A) aumento de 1000X e grau intenso (B) aumento de 400X.



Fonte: Takakura, 2020.

As colheitas de material para estudo histopatológico foram realizadas após a colheitas de material para citologia endometrial. A mão do técnico, protegida por luva e lubrificada, era inserida por via vaginal para introduzir a pinça de Yeoman (Botupharma®) estéril revestida por camisa sanitária plástica (IMV®, França) (Figura 4). Ao adentrar o óstio caudal da cérvix a camisa sanitária era rompida e a pinça inserida até a extremidade cranial do corpo, na região de bifurcação dos cornos. A mão do técnico era retirada da vagina e por via retal realizava-se pressão do útero contra a pinça. Fechava-se a pinça para apreender o fragmento e tracionava-se caudalmente para retirada do útero. As amostras foram fixadas em solução tamponada de formol a 10% e encaminhada para o Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras onde foram preparados os cortes e corados com hematoxilina e eosina.

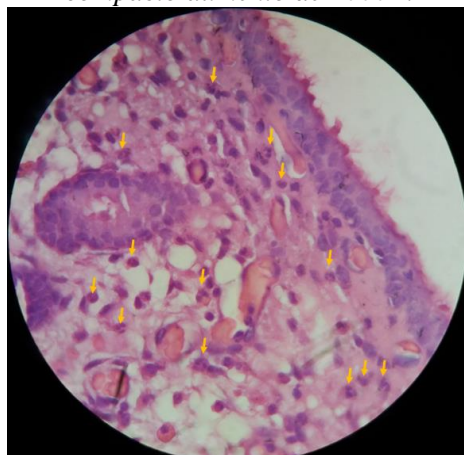
Figura 4 - Pinça e camisa sanitária utilizadas para colher fragmento endometrial para histologia.



Fonte: Takakura, 2020.

Foi realizada a contagem de neutrófilos presentes em 5 campos de cada corte histológico. O resultado foi considerado positivo quando identificado 1 neutrófilo por campo ou mais. O número de neutrófilos por campo também foi aferido para que fosse possível a comparação dos dados anteriores e posteriores aos tratamentos controle e teste.

Figura 5 - Corte histológico do endométrio com presença de PMNs (setas amarelas) no estrato compacto aumento de 1000X.



Fonte: Takakura, 2020

3.5. Preparo da Solução Fisiológica Ozonizada.

Para ozonizar a solução fisiológica foi utilizado um equipamento gerador de ozônio portátil modelo O&L 1.5 (Ozone&Life®). Através de equipo estéril acoplado à saída do gás mistura de ozônio/oxigênio, na concentração de 52 µg de O₃/mL de oxigênio obtida através da regulagem do fluxômetro de entrada de O₂ em ¼ litros por minuto na máxima potência da máquina. O gás era injetado continuamente durante 10 minutos na parte inferior do frasco, de forma que o gás percorresse através da coluna de solução, sendo liberado para a parte superior do frasco onde era acoplado um dispositivo detruidor de ozônio pelo qual o gás residual atravessava para não haver liberação do O₃ para o ambiente (*Figura 6*).

Devido à instabilidade do ozônio em soluções aquosas a lavagem uterina era realizada imediatamente após o preparo da solução.

Figura 6 - Preparo da solução ozonizada e sistema para infusão uterina.



Fonte: Takakura, 2020

3.6. Lavagens Uterinas

Vinte e três animais foram submetidos à lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada e dez à lavagem uterina com solução fisiológica sem prévia ozonização. Após a

colheita de material para histopatologia a região perineal era novamente higienizada para se proceder a lavagem. Com a mão protegida por luva plástica de cano longo, uma sonda de calibre 32 mm era inserida no útero por via vaginal e mantida segura após adentrar a cérvix, para evitar refluxo, pela mão do técnico durante todo o procedimento. A solução era inserida perfazendo no total 1L, mantida dentro do útero por 10 minutos e posteriormente drenada por gravidade. Ao término da lavagem era administrado 15 UI de ocitocina por via intramuscular para auxiliar na drenagem de solução remanescente.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, os dados analisados com o software JMP Pro 12 (SAS, Cary, NV-EUA) e a diferença entre os tratamentos verificada. O modelo testou os efeitos de tratamento, e interação tratamento * campo, e animal (tratamento) como erro aleatório. Os dados foram submetidos a avaliação de normalidade com o teste de Shapiro Wilk. A distribuição de frequência dos dados de histologia foi de Poisson, sendo então analisados por modelos linearizados, com função Logit e ajustes para sobredispersões. O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$ para comparação de médias. Os dados referentes a análise citológica foram modelados ajustando uma regressão logística Freedeman(2009), com os parâmetros usados sendo, (0) sem modificação, (1) melhora e (2) agravamento. Utilizando a categorização estabelecida para situação do animal, pode-se aplicar o teste qui-quadrado para independência Cohen(1976), que visa verificar a diferença significativa entre os dois tratamentos com relação ao status de melhora ou não do animal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 33 animais com histórico de infertilidade selecionados para o experimento, 11 (33,3%) apresentaram resultado negativo no exame de citologia endometrial. Falsos negativos na citologia podem ocorrer por falha no procedimento de obtenção da amostra ou por atuação dos mecanismos de defesa de algumas bactérias anaeróbias que aumentam a viscosidade do muco como forma de escape da defesa celular. Overbeck e colegas obtiveram 6 amostras de citologia negativa em éguas com endometrites causada por *E. coli* (OVERBECK et al, 2011). Rua e colaboradores (2018) avaliando 51 animais com histórico de infertilidade, obtiveram 25,5% de resultados negativos no exame de citologia endometrial. Outro estudo já havia documentado que em apenas 12% das culturas positivas para anaeróbios as evidências citológicas de inflamação estavam presentes (RICKETTS e MACKINTOSH, 1987), mostrando que a citologia é falha quando utilizada como único método para diagnosticar inflamação endometrial.

Dos animais considerados positivos para citologia endometrial, 5 apresentaram grau leve de inflamação, 8 grau moderado e 9 grau intenso previamente ao tratamento. Após a aplicação do tratamento controle (TC), 4 animais não apresentaram alteração na contagem de neutrófilos, 5 apresentaram melhora e 1 apresentou agravamento. Após a aplicação do tratamento com ozônio (TO), 5 animais não apresentaram alteração na contagem, 11 apresentaram melhora e 8 agravamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Contingência das frequências observadas no exame citológico após os tratamentos

Tratamento	Sem Mudança	Melhora	Agravamento
TC	4(40%)	5(50%)	1(10%)
TO	5(21,7%)	11(47,8%)	7(31,5%)
Total	9(27,3%)	16(48,5%)	8(24,2%)

De acordo com as frequências observadas na tabela de contingencia, temos que no tratamento TC 50% dos animais apresentaram melhora no quadro e para o TO 47,83%. O valor-p no teste de 0,3301 corroborando com a regressão logística e não foi possível rejeitar hipótese de igualdade de eficácia dos tratamentos.

Neste estudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos quando levada em consideração o resultado da contagem de neutrófilos obtido através de citologia.

No exame histológico, apenas 3 animais (9%) obtiveram resultado negativo à presença de PMNs no estrato compacto do endométrio previamente aos tratamentos. A presença de PMNs no estrato compacto endometrial durante a avaliação histopatológica é atualmente o método mais confiável, chamado de “padrão ouro” para o diagnóstico da endometrite, sendo usado como referência para diagnóstico (NIELSEN, 2005; LEBLANC et al., 2007; OVERBECK et al., 2011, KOZDROWSKI et al., 2015, RUA et al., 2018). Neste sentido, o presente estudo considerou os resultados da histologia como referência para comparação dos efeitos dos tratamentos aplicados.

Na análise histológica, a distribuição de frequência da contagem de neutrófilos foi caracterizada como sendo modelada por uma Poisson (Freedeman, 2009), com a maior proporção de valores baixos e menor de valores muito altos para ambos tratamentos. Antes dos tratamentos a média de contagem de neutrófilos diferiu entre TC e TO, não havendo efeito de repetição.

Usando o modelo de Poisson para verificar diferença na contagem de neutrófilos verificou-se média do grupo TO superior a do grupo TC ($p < 0,0001$). Levando em conta o momento antes da aplicação dos tratamentos.

No tratamento TC, os animais apresentaram uma contagem média de neutrófilos 9,9 ($\pm 2,43$), com um desvio padrão de 8,5, erro padrão da média de 1,2 e mediana de 8, previamente ao tratamento, e após a aplicação de TC a média de neutrófilos foi de 3,54 ($\pm 1,29$), com um desvio padrão de 4,5, erro padrão da média de 0,63 e mediana de 2. No tratamento TO, a contagem média de neutrófilos foi de 12,29 ($\pm 3,28$), com um desvio padrão de 17,76, erro padrão da média de 1,65 e mediana de 3, previamente ao tratamento, e após a aplicação de TO a média foi de 1,61 ($\pm 0,45$), com um desvio padrão de 2,42, erro padrão da média de 0,22 e mediana de 1.

Tabela 2 - Média das contagens de PMNs na histologia endometrial antes e depois dos tratamentos

	Número de PMNs	
	Antes	Depois
Solução fisiológica	9,9 ($\pm 2,43$)	3,54 ($\pm 1,29$) ^a
Solução fisiológica ozonizada	12,29 ($\pm 3,28$)	1,61 ($\pm 0,45$) ^b

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($P < 0,001$).

PMNs, neutrófilos polimrfonucleares

Foi observado pelas estatísticas descritivas uma maior eficiência do tratamento TO depois da aplicação dos tratamentos na contagem média de neutrófilos. Após a modelagem constatou-se que a contagem foi inferior ($p < 0,0001$) para os animais tratados TO quando comparada com o controle. Ocorreu a diminuição na contagem média de neutrófilos após a aplicação do tratamento TO e diminuição no valor do desvio padrão, assim como ocorrido com o tratamento TC. Entretanto, o valor médio da contagem de neutrófilos foi inferior quando se utilizou o tratamento TO, evidenciando uma maior eficácia do tratamento TO quando a intenção é a diminuição no valor dessa contagem indicando diminuição da inflamação no endométrio.

Considerando o resultado histológico negativo após o tratamento, ou seja, a cura, o presente trabalho demonstrou que 14 (61%) dos animais tratados com TO foram curados e que apenas 3 (30%) dos animais tratados com TC apresentaram cura.

Os efeitos positivos da utilização do ozônio na reprodução de bovinos foram comprovados por estudos que afirmaram ocorrer aumento da eficiência reprodutiva das vacas e diminuição da utilização de antibióticos. Em estágios iniciais de certas patologias reprodutivas, principalmente endometrites, evita o agravamento e a necessidade do uso de antimicrobianos (DURICIC et al, 2014; DURICIC et al 2015a). Em geral, resultados demonstram que o efeito é similar, ou mais eficiente, em tratamentos reprodutivos quando comparados aos resultados dos tratamentos convencionais com a vantagem de não produzir efeitos adversos e liberar resíduos no leite e ambiente (ZOBEL et al, 2012a; ZOBEL et al, 2012b; DURICIC et al 2015a; DURICIC et al 2015b, POLAT et al 2015; IMHOF et al 2019).

Em éguas, lavagens uterinas utilizando água ozonizada produziram resultados interessantes para tratamento de éguas com falha reprodutiva. No estudo, 6 éguas com histórico de falha reprodutiva engravidaram após o tratamento (HEREDIA, 2013). Montechiesi e Ignácio (2018) obtiveram sucesso ao tratar um caso de endometrite por *Pseudomonas* sp. utilizando lavagens uterinas com soro ozonizado e insuflação do útero com mistura de oxigênio ozônio.

Os benefícios do ozônio intrauterino provavelmente se devem pela ação antimicrobiana potente sobre bactérias e fungos. A resistência é a principal causa de falha em tratamentos que utilizam antibióticos e contínuo aumento da amplitude deste fenômeno estabelece sério problema terapêutico na erradicação de infecções (FRANZINI et al, 2016). O efeito oxidativo do ozônio interfere na integridade da parede celular das bactérias desestabilizando os fosfolípidos e lipoproteínas de membrana. Nos fungos o O₃ inibe a divisão celular em certos estágios (ELVIS e EKTA, 2011). Ainda não há relatos sobre bactérias e fungos resistentes aos danos oxidativos provocado pelo ozônio.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a utilização de apenas uma lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada causa redução significativa ($p < 0,0001$) na presença de PMNs no endométrio inflamado. Portanto, esta modalidade de tratamento pode ser utilizada em animais portadores de endometrite clínica e subclínica, e na rotina de doadoras de embrião susceptíveis a endometrite pós cobertura persistente.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, K.A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. **Effect of uterine inflammation and ultrasonically - detected uterine pathology on fertility in the mare**. Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 35, p.445-454, 1987.
- ALBINH, A.; BÂVERUD, V.; MAGNUSSON, U. **Uterine Microbiology and Antimicrobial Susceptibility in Isolated Bacteria from Mares with Fertility Problems**. Acta Veterinaria Scandinavica, v.44, p.121-129, 2003.
- ALGHAMDI, A.S.; FOSTER, D.N.; CARLSON, C.S.; TROEDSSON, M.H. **Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis**. American Journal of Reproductive Immunology, v.53, p.230-237, 2005.
- ALLEN, W.E.; PYCOCK, J.F. **Inflammatory components in uterine fluids from mares with experimentally induced bacterial endometritis**. Equine Veterinary Journal, v.22, p.422-425, 1990.
- ALVES, G.E.S.; ABREU, J.M.G.; RIBEIRO FILHO, J.D.; MUZZI, L.A.L., OLIVEIRA, H.P.; TANNUS, R.J.; BUCHANAN, T. **Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em equinos**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.56, p.433-437, 2004.
- AMORIM, M. D.; GARTLEY, C. J.; FOSTER, R. A., HILL, A.; SCHOLTZ, E. L.; HAYES, A.; CHENIER, T. S. **Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low-volume lavage, and uterine biopsy and combinations in the diagnosis of equine endometritis**. Journal of Equine Veterinary Science, v.44, p.54-61, 2016.
- ANZOLIN, A.P.; BERTOL, C. D. **Ozone therapy as an integrating therapeutic in osteoarthritis treatment: a systematic review**. Brazilian Journal of Pain, n.1, v.2, p.171-175, 2018.
- BALL, B. A.; SHIN, S. J.; PATTEN, V. H.; LEIN, D. H.; WOODS, G. L. **Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium**. Theriogenology, v.29, n.6, p.1269-1283, 1988.
- BOCCI, V; BORRELLI, E.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. **The usefulness of ozone treatment in spinal pain**. Drug Design, Development and Therapy, v.9, p.2677-2685, 2015.
- BOCCI, V. **Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis**. Medical Hypotheses, v.39, p. 30-34, 1992.
- BOHN, A.A.; FERRIS, R.A.; McCUE, P.M. **Comparison of equine endometrial cytology samples collected with uterine swab, uterine brush, and low-volume lavage from healthy mares**. Veterinary Clinical Pathology, v.43, p.594-600, 2014.

BRADECAMP, E.A. **Pneumovagina**. In: Equine Reproduction. McKINNON, E.L.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. Blackwell Publishing Ltd, 2.ed., p. 2538-2544, 2011.

BRADECAMP, E.A.; AHLSCHEWEDE, S.A.; COOK, J.L. **The effects of intra-uterine kerosene infusion on endometrial epithelial cilia concentration**. Journal of Equine Veterinary Science, v.34, p.134, 2014.

BRACHER, V.; NEUSCHAEFER, A.; ALLEN, W.R. **The effect of intra-uterine infusion of kerosene on the endometrium of mares**. Journal of Reproduction and Fertility, suppl., v.44, p.706-707, 1991.

BRENDEMUEHL, J.P.; KOPP, K.; ALTMAN, J. **Influence of dietary algal N-3 fatty acids on breeding induced inflammation and endometrial cytokine expression in mares bred with frozen semen**. Journal of Equine Veterinary Science, v.34, p.123-124, 2014.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; SHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. **Manual of Equine Reproduction**, 3.ed, Elsevier, 2011.

BRITO, L.F.C., BARTH, A.D. **Endometritis in mares**. Large Animal Veterinary Rounds, v.3, n.9, 2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/213858523_Endometritis_in_mares. Acesso em 20 jun de 2019.

BUCZKWSKA, J.; KOZDROWSKI, R.; NOWAK, M.; RAS, A.; STARONIEWICZ, Z.; SIEMIENIUCH, M.J. **Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares**. Reproductive Biology and Endocrinology, n.12, v.27, 2014. Disponível em <http://www.rbej.com/content/12/1/27> . Acesso em 20 maio de 2019.

BUCZKOWSKA, J.; KOZDROWSKI, R.; NOWAK, M. SIKORA, M. **Relationship between uterine biopsy score, endometrial infection and inflammation in the mare**. Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere Nutztiere, v.44, p.158-163, 2016.

BUCZKOWSKA, J.; KOZDROWSKI, R.; SIKORA, M.; DZIECIOL, M.; MATUSZ, A. **Non-traditional treatments for endometrites in mares**. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, v.18, n.4, p.285-293, 2015.

CALUNGA, J.L.; MENÉNDEZ, S.; LÉON, R.; CHANG, S.; GUANCHE, D.; BALBÍN, A.; ZAYAS, J.; GARCÍA, P. **Application of Ozone Therapy in Patients with Knee Osteoarthritis**. Ozone: Science and Engineering, v.34, p.469-475, 2012.

CANISSO, I. F., STEWART, J., SILVA, M. A. C. **Endometritis - Managing Persistent PostBreeding Endometritis**. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, v.32, p.465-480, 2016.

CASLICK, E.A. **The vulva and vulvovaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare**. Cornell Veterinary, v.27, p.178-197, 1937.

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

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

COCCHIA N.; PACIELLO O.; AULETTA L. **Comparison of the cytobrush, cotton swab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares.** *Theriogenology*, v.77, p.89-98, 2012.

COHEN, Joel E. **The distribution of the chi-squared statistic under clustered sampling from contingency tables.** *Journal of the American Statistical Association*, v. 71, n. 355, p. 665-670, 1976.

COSTERTON, J.W. STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. **Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections.** *Science*, v.284, p.1318-1322, 1999.

COUTO, M.A.; HUGHES, J.P. **Thechniques and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare.** *Equine Veterinary Science*, v.4, p.265-273, 1984.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. **Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.4, p.434-461, 2010.

DASCANIO, J.J.; SCHWEIZER, C.; LEY, W.B. **Equine fungal endometritis.** *Equine Vet Education*, v.13, p.324-329, 2001.

DAVIS MOREL, M.C.G.; LAWLOR, O.; NASH, D.M. **Equine endometrial cytology and bacteriology: Effectiveness for predicting live foaling rates.** *The Veterinary Journal*, v.198, p.206-211, 2013.

DIÁZ-SOTO, M.T.; PÉREZ, A.F.; VAILLANT, J.D.; MALLOK, A.; VIEBAHN-HÄNSLER, R.; CEPERO, S.M.; FERNÁNDEZ, O.S. **Ozone Therapy Ameliorates Nervous System Disorders and Oxidative Stress in Patients During Ethanol Withdrawal—A Pilot Study.**

Ozone: Science & Engineering, v.34, p.432–437, 2012.

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

DIEL DE AMORIM, M.; GARTLEY, C.J. FOSTER, R.A.; HILL, A.; SCHOLTZ, E.L.; HAYES, A.; CHENIER, T.S. **Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of Equine Endometritis.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v.44, p.54-61, 2016.

DLUGOLECKA, E.; TOBOLSKI, D.; JANOWSKI, T. **Endometrial histopathology, bacteriology and cytology outcomes in mares with early embrionic death (EED): a field study.** *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v.22. n.2, p.377-384, 2019.

DURICIC, D.; LIPAR, M.; SAMARDZIJA, M. **Ozone treatment of metritis and endometritis in Holstein cows.** Veterinarski Archiv, v.84, n.2, p.103-110, 2014.

DURICIC, D.; VALPOTIC, H.; SAMARDZIJA, M. **Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge.** Animal Reproduction Science, v.159, p.1-7, 2015a.

DURICIC, D.; VALPOTIC, H.; SAMARDZIJA, M. **The Intrauterine Treatment of the Retained Foetal Membrane in Dairy Goats by Ozone: Novel Alternative to Antibiotic Therapy.** Reproduction in Domestic Animals, v.50, p. 236-239, 2015b.

DYBDAL N. O.; DAELS P. F.; COUTO M. A.; HUGHES J. P.; KENNEDY P. C. **Investigation of the reliability of a single endometrial biopsy sample, with a note on the correlation between uterine cysts on biopsy grade.** ISER Proc 1991; 5:697.

ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. **Ozone therapy: A clinical review.** Journal of Natural Science, Biology and Medicine, v.2, n.1, p.66-70, 2011.

EVANS, M.J.; HAMER, J.M.; GASON, L.M.; GRAHAM, C.S.; ASBURY, A.C.; IRVINE, C.H.G. **Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment.** Theriogenology, v.26, n.1, p.37-50, 1986.

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

FEDORKA, C.E.; SCOGGIN, K.E.; WOODWARD, E.M.; SQUIRES, E.L.; BALL, B.A.; TROEDSSON, M.H.T. **The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis.** Reproduction in Domestic Animals, v.52, p.89-96, 2016.

FEDORKA, C.E.; SCOGGIN, K.E.; BOAKARI, Y.L.; HOPPE, N.E.; SQUIRES, E.L.; BALL, B.A.; TROEDSSON, M.H.T. **The anti-inflammatory effect of exogenous lactoferrin on breeding-induced endometritis in susceptible mares when administered post-breeding in susceptible mares.** Theriogenology, v.114, p.63-69, 2018.

FERRIS, R.A. **Bacterial endometrites: a focus on biofilms.** Clinical Theriogenology, v.6, p.315-319, 2014.

FERRIS, R.A. **Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.41, n.1. p. 74-80, 2017a.

FERRIS, R.A. **Therapeutics for infectious endometritis: A clinical perspective.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.41, n.1, p.175-179, 2017b.

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

FRANZINI, M.; VALDENASSI, L.; IONITA, G. **First evaluations of oxygen-ozone therapy in antibiotic-resistant infections.** *Ozone Therapy*, v.1:38, p.5-7, 2016.

FREEDMAN, David A. **Statistical models: theory and practice.** Cambridge university press, 2009.

FRISO, A.M.; SEGABINAZZI, L.G.T.M.; CYRINO, M.; CORREAL, S.B.; DELL'AQUA, C.P.F.; CARMO, M.T.; DELL'AQUA, J.A.Jr.; MIRO, J.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **Periovarian administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares.** *Theriogenology*, v.138, p.24-30, 2019.

FUMUSO, E.; GIGUERRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.; BOWDEN, R.A. **Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNA expression. In mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. Effects of oestrous cycle, artificial insemination and immunomodulation.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.96, p.31-40, 2003.

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

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; WILTBANK, GINTHER, O.J. **Follicle Deviation and Intrafollicular and Systemic Estradiol Concentrations in Mares.** *Biology of Reproduction*, v.61, p.31-39, 1999.

GOMES, G.M.; CRESPILO, A.M.; LEÃO, K.M.; JACOB, J.C.F.; GOMES, L.P.M.; SEGABINAZZI, L.G.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **Can sperm selection, inseminating dose and artificial insemination technique influence endometrial inflammatory response in mares?** *Journal of Equine Veterinary Science*, v.73, p.43-47, 2019.

GONZÁLEZ, C.; MORENO, L.; FUMUSO, E.; GARCÍA, J.; RIVULGO, M.; CONFALONIERI, A.; SPARO, M.; SÁNCHEZ BRUNI, S. **Enrofloxacin-based therapeutic strategy for the prevention of endometritis in susceptible mares.** *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic*, v.33, p.287-294, 2010.

GOES-LINDHOLM, A.R.; LEBLANC, M.M.; CAUSEY, R.; HITCHBORN, A.; FAYRER-HOSKEN, R.A.; KRUGER, M.; VANDEPLAS, M.L.; FLORES, P.; AHLSCHEDE, S. **Relationship between intrauterine infusion of N-acetylcysteine, equine endometrial pathology, neutrophil function, post-breeding therapy, and reproductive performance.** *Theriogenology*, v.80, p.218-227, 2013.

HENNEKE D. R., POTTER G. D., KREIDER J. L., YEATES B. F. **Relationship between condition score, physical measurement, and body fat percentage in mares.** *Equine Veterinary Journal*, v.15, p.371-372, 1983.

HEMBERG, E.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S. **Retrospective Study on Vulvar Conformation in Relation to Endometrial Cytology and Fertility in Thoroughbred Mares.** *Journal of Veterinary Medicine*, v.52, p.474-477, 2005.

- HEREDIA, M.; **Lavaje uterino com Agua ozonizada para el tratamiento de endometrites em yeguas.** In: **IV World Congresso f Oxygen-Ozone Therapy.** International Journal of Ozone Therapy, v.12, p. 174-176, 2013.
- HUGHES, J.P.; LOY, R.G. **Investigations on the effect of intrauterine inoculations of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare.** Proceedings Am Assoc Equine Pract, v.15, p.289-292, 1969.
- HUGHES, J.P.; LOY, R.G. **The relation of infection to infertility in the mare and stallion.** Equine Veterinary Journal, v.7, n.3, p.155-159, 1975.
- INOUE, Y., SEKIGUCHI, M. **Vestibuloplasty for Persistent Pneumovagina in Mares.** Journal of Equine Veterinary Science, v.48, p.9–14, 2017.
- IMHOF, S.; LUTERNAUER, M.; HÜSLER, J.; STEINER, A.; HIRSBRUNNER, G. **Therapy of retained fetal membranes in cattle: comparison of two treatment protocols.** Animal Reproduction Science, v.206, p.11-16, 2019.
- JMP®, Version <12>. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2019.
- KATILA, T. **Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen.** Biology of Reproduction, v.52, p.515-517, 1995.
- KATILA, T. **Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus.** Reproduction in Domestic Animals, v.47, Suppl.5, p.31–41, 2012.
- KENNEY, R.M. **Prognostic value of endometrial biopsy of the mare.** Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 23, p.347-348, 1975.
- KENNEY, R.M. **Cyclic and pathology changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death.** Journal of the American Veterinary Medical Association, v.172, p.241-262, 1978.
- KHAN, F.A.; CHENIER, T.S.; MURRANT, C.L.; FOSTER, R.A.; HEWSON, J.; SCHOLTZ, E.L. **Dose-dependent inhibition of uterine contractility by nitric oxide: A potential mechanism underlying persistent breeding-induced endometritis in the mare.** Theriogenology, v.90, p.59-64, 2017.
- KHAN, F.A.; CHENIER, T.S.; FOSTER, R.A.; HEWSON, J.; SCHOLTZ, E.L. **Endometrial nitric oxide synthase activity in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis and the effect of a specific iNOS inhibitor in vitro.** Reproduction in Domestic Animals, v.53, p.718-724, 2018.
- KNUTTI, B.; PYCOCK, J.F.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; KÜPFER, U. **The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding.** Equine Veterinary Education, v.5, p. 267-270, 2010.
- KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. **Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus.** Theriogenology, v.41, p.629-636, 1994.

KOZDROWSKI, R.; SIKORA, M.; BUCZKOWSKA, J.; NOWAK, M.; RAS, A.; DZIECIOL, M. **Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares.** *Animal Reproduction Science*, v.154, p.56-62, 2015.

LeBLANC, M.M. **Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare.** *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, supplement 2, p.21-27, 2010.

LeBLANC, M.M. **Persistent Mating Induced Endometritis in the Mare: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. Recent Advanced in Equine Reproduction.** *International Veterinary Information Service*. Disponível em www.ivis.org2003. Acesso em 20 abr 2019.

LeBLANC, M.M.; CAUSEY, R.C. **Clinical and subclinical endometrites in the mare: both treats to fertility.** *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p. 10-22, 2009.

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

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

LIN, J.; NISHINO, K.; ROBERTS, M.C.; TOLMASKY, M.; AMINOV, R.; ZHANG, L. **Mechanisms of antibiotic resistance.** *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-3, 2015.

LIU, I.; RAKESTRAW, P.A.; COIT, C.; HARMON, F.; SNYDER, J. **An in vitro investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility.** *Pferdeheilkunde*, v.13, p.557, 1997.

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

MACKAY, R.J. **Inflammation in horses.** *Immunology*, v.16, n.1, p.15-27, 2000.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction.** 2.ed. Wiley-Blackwell, 2011. 3288p.

MENÉNDEZ, S.; CEPERO, J.; BORRENGO, L. **Ozone Therapy in Cancer Treatment: State of the Art.** *Ozone: Science and Engineering*, v.30, p.398-404, 2008.

MONTECHIESI, D.F.; IGNÁCIO, F.S. **Ozonioterapia local para tratamento de infecção uterina em éguas.** *ARS Veterinária*, v.34, n.4, suplemento, p.147, 2018.

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

NIELSEN, J.M.; NIELSEN, F.H.; PEERSEN, M.R. **Diagnosis of equine endometritis – microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and correlation to fertility.** *Pferdeheilkunde*, v.28, p.8-13, 2012.

- OHTSUKA, H.; OGATA, A.; TERASAKI, N.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. **Changes in Leukocyte Population after Ozonated Autohemoadministration in Cows with Inflammatory Diseases.** Journal of Veterinary Medical Science, v.68, n.2, p.175-178, 2006.
- OVERBECK, W.; WITTE, T.S.; HEUWIESER, W. **Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares.** Theriogenology, v.75, p.1311-1318, 2011.
- OZBAYA, I.; ITAL, I.; KUCURA, C.; AKCILARC, R.; DEGERD, A.; AKTASE, S. OGHANA, F. **Effects of ozone therapy on facial nerve regeneration.** Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, n.83, v.2, p.168-175, 2017.
- PAPA, F.O.; LOPES, M.D.; ALVARENGA, M.A.; MEIRA, C.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LANGONI, H.; RIBEIRO, E.F.; AZEDO, A.E.; BOMFIM, A.C.M. **Early embryonic death in mares: clinical and hormonal aspects.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 35, n.4, p. 170-173, 1998.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, P.M.; GUAISTI, P.N.; MAZIERO, R.R.D.; DERUSI, A.A.P.; MAGALHÃES, L.C.O.; MARTIN, J.C.; MARTIN, I. **Equine Perineal and Vulvar Conformation Correction Using a Modification of Pouret's Technique.** Journal of Equine Veterinary Science, v. 34, p.459-464, 2014.
- PASCOE, R.P. **Observations of the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare.** Journal of Reproduction and Fertility, Supplement, v.27, p.299-305, 1979.
- PÉREZ, N.I.M.; FERNÁNDEZ, J.L.C.; CEPERO, S.M. **Ozonoterapia em el síndrome de malabsorción intestinal secundário a parasitismo por *Giardia lamblia*: Estudio preliminar.** Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas, v.22, n.3, p.145-149, 2003.
- PÉREZ-MARÍN, C.C.; VIZUETE, G.; BORGE, C.; GALISTEO, J.J. **Cytological and Bacteriological Sampling from filters used for embryo recovery to evaluate the uterine status of donor mares.** Acta Veterinaria Hungarica, v.66, p.462-473, 2018.
- PETERSEN, M.R.; NILSEN, J.M.; LEHN-JENSEN, H.; BOJESEN, A.M. **Streptococcus equi subspecies zooepidemicus resides deep in the chronically infected endometrium of mares.** Clinical Theriogenology, v.1, p.393-409, 2009.
- PETERSEN, M.R.; SKIVE, B.; CHRISTOFFERSEN, M.; LU, K.; NIELSEN, J.M. TROEDSSON, M.H.T. **Activation of persistent Streptococcus equi subspecies zooepidemicus in mares with subclinical endometritis.** Veterinary Microbiology, v.179, p.119-125, 2015.
- POLAT, B.; CENGİZ, M.; ÇOLAK, A.; CANNAZİK, O. **Comparison of Intrauterine Ozone and Rifaximine Treatment in Cows with Subclinical Endometritis.** Kafkas Universitesi Veteriner Faku ltesi Dergisi, v.21, n.5, p.773-776, 2015.
- PYCOCK, J.F.; NEWCOMBE, J.R. **Assessment of the effect of three treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare.** Veterinary Record, v.138, p.320-323, 1996.

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

RASMUSSEN, C.D.; PETERSEN, M.R.; BOJESEN, A.M.; PEDERSEN, H.G.; LEHN-JENSEN, H.; CHRISTOFFERSEN, M. **Equine Infectious Endometritis - Clinical and Subclinical Cases.** Journal of Equine Veterinary Science, v.35, p.95-104, 2015.

RE, L.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; BORDICCHIA, M.; MALCANGI, G.; POCOGNOLI, A.; MORALES-SEGURA, M.A.; ROTHCHILD, J.; ROJAS, A. **Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result.** European Journal of Pharmacology, v.742, p.158-162, 2014.

RECIO DEL PINO, E.; SERRANO, M.A.; RODRÍGUEZ DEL RIO, M. **Aspectos de la ozonioterapia em pacientes com neuropatia epidémica.** Revista Cubana de Enfermería, v.15, p.114-118, 1999.

REITZENSTEIN, M.; CALLAHAN, M.A.; HANSEN, P.; LeBLANC, M.M. **Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin.** Theriogenology, v.58, p.887-898, 2002.

RICKETTS, S.W.; BARRELET, A. **The ability of mares to respond to treatment for uterine abnormalities diagnosed by endometrial biopsy and some causes for failure to respond – a review of 1099 cases.** Pferdeheilkunde, v.17, p.644-649, 2001.

RICKETTS, S.W.; MACKINTOSH, M.E. **Role of anaerobic bacteria in equine endometritis.** Journal of Reproduction and Fertility Supplement, v. 35, p.343-351, 1987.

RIDDLE, W. T., LEBLANC, M. M., STROMBERG, A. J. **Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice.** Theriogenology, v.68, p. 395-402, 2007.

RODRÍGUEZ, Z.B.Z.; GONZÁLEZ, E.F.; LOZANO, O.E.L.; URRUCHI, W.I. **Ozonioterapia em Medicina Veterinária.** 1.ed, Editora Multimídia, São Paulo, 2017, 282p.

RUA, M.A.S.; QUIRINO, C.R.; RIBEIRO, R.B.; CARVALHO, E.C.Q.; BERNADINO, M.L.A.; BARTHOLAZZI, A. CIPAGALTA, L.F.; BARRETO, M.A.P. **Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares.** Theriogenology, v.114, p.285-292, 2018.

SAMPER, J.C. **Uterine edema in the mare.** In: Equine breeding management and artificial insemination. 2 ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, p.133-138, 2009.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. **Uterus biopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute.** Pferdeheilkunde, v.8, p.355-362, 1992.

SCOFIELD, D.B.; WITTENBURG, L.A.; FERRIS, R.A.; GUSTAFSON, D.L.; McCUE, P.M. **Equine endometrial tissue concentration of Fluconazole following oral administration.** Journal of Equine Veterinary Science, v.33, n.1, p.44-50, 2013.

- SEGABINAZZI, L.G.; FRISO, A.M.; CORREAL, S.B.; CRESPILO, A.M.; DELL'AQUA JR. A.; MIRÓ, J.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **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*, v.104, p.120-126, 2017.
- SKIVE, B.; ROHDE, M.; MOLINARI, G.; BRAUNSTEIN, T.H.; BOJENSEN, A.M. **Streptococcus equi subsp. zooepidemicus Invades and Survives in Epithelial Cells.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v.7, 2017.
- SNIDER, T.A.; SEPOY, C.; HOLYOAK, G.R. **Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopatologic data.** *Theriogenology*, v.75, p.1567-1581, 2011.
- STROKER, G.; C.M.G.; IREL, M.R.C.P.; M.R.C.S. **The surgical uses of ozone.** *The Lancet*, v.189, p.797, 1917.
- STOKER, G., IREL, M.R.C.P.; ENG, M.R.C.S. **The surgical uses of ozone.** *The Lancet*, v.188, p.712, 1916.
- SZEKERES-BARTHO, J.; POLGAR, B.; KOZMA, N.; MIKO, E.; PAR, G.; SZEREDAY, L. **Progesterone –dependent immunomodulation.** *Chemical Immunology and Allergy*, v.89, p.118-125, 2005.
- SZPONDER, T.; WESSELY-SZPONDER, J.; SWIÉCA, M.; SMOLIRA, A.; GRUSZECKIE, T. **The combined use of ozone therapy and autologous platelet-rich plasma as an alternative approach to foot rot treatment for sheep. A preliminary study.** *Small Ruminant Research*, v.156, p.50-56, 2017.
- TROEDSSON, M.H.T. **Therapeutic considerations for mating-induced endometritis.** *Pferdeheilkunde*, v.13, p.516-520, 1997.
- TROEDSSON, M.H.T. **Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare.** *Theriogenology*, v.52, p.461-471, 1999.
- TROEDSSON, M.H.T. **Post-breeding uterine inflammation: the role of seminal plasma.** *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 56, p.341-349, 2000.
- TROEDSSON, M.H.T. **Endometritis.** In: *Equine Reproduction*. McKINNON, E.L.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. Blackwell Publishing Ltd, 2.ed. p.2608-2619, 2011.
- TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. **Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination.** *Animal Reproduction Science*, v. 89, p.171-186, 2005.
- TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.; ING, M.; PASCOE, J., THURMOND, M. **Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial**

challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. Journal of Reproduction and Fertility, v.99, p. 307-313, 1993.

TROEDSSON, M.H.T.; SCOTT, M.A.; LIU, I.K. **Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection.** Animal Journal of Veterinary Research, v.56, p.468-472, 1995.

TSUZUKI, N.; ENDO, Y.; KIKKAWA, L.; KOROSUE, K.; KANEKO, Y.; KITAUCHI, A.; KATAMOTO, H.; HIDAKA, Y.; HAGIO, M.; TORISU, S. **Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses.** Journal of Veterinary Medical Science, v.77, n.12, p.1647-1650, 2015.

VIEBAHN-HÄNSLER, R.; FERNÁNDEZ, O.S.L.; FAHMYA, Z. **Ozone in Medicine: Clinical Evaluation and Evidence Classification of the Systemic Ozone Applications, Major Autohemotherapy and Rectal Insufflation, According to the Requirements for Evidence-Based Medicine.** Ozone Science & Engineering, v.38, n.5, p. 322-345, 2016.

VIGLIANI, A.; BONIPERTI, E.; SCUDO, E. **Paravertebral O₂-O₃ Treatment in Mechanical Lumbar Pain in Riding Horses.** Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia, v.4, p.64-69, 2005.

VON REINTZENSTEIN, M.; CALLAHAN, M.A.; HANSEN, P.J.; LeBLANC, M.M. **Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin.** Theriogenology, v.58, p.887-898, 2002.

WOODS, G.L.; BAKER, C.B.; HILLMAN, R.B.; SCHILAFER, D.H. **Recent studies relating to early pregnancy death in the mare.** Equine Veterinary Journal, supplement 3, p.104-107, 1985.

WOODWARD, E.M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; BETANCOURT, A.; HOROHOV, D.; SCOGGIN, K.E.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H.T. **Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis.** Reproduction, v.145, p.289-296, 2013.

ZOBEL, R.; TKALCIC, S. **Efficacy of Ozone and Other Treatment Modalities for Retained Placenta in Dairy Cows.** Reproduction in Domestic Animals, v.48, p.121-125, 2012a.

ZOBEL, R.; TKALCIC, S.; STOKOVIC, I.; PIPAL, I.; BUIC, V. **Efficacy of Ozone as a Novel Treatment Option for Urovagina in Dairy Cows.** Reproduction in Domestic Animals, v.2, p.293-298, 2012b.