

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

LAURA BRAVO DEFANTI VENÂNCIO PETRUCCI

**EFEITO DO LAVADO UTERINO COM RINGER COM LACTATO OZONIZADO NO
TRATAMENTO DE ENDOMETRITES EM ÉGUAS**

Campos dos Goytacazes

2023

LAURA BRAVO DEFANTI VENÂNCIO PETRUCCI

**EFEITO DO LAVADO UTERINO COM RINGER COM LACTATO OZONIZADO NO
TRATAMENTO DE ENDOMETRITES EM ÉGUAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração de Reprodução e Saúde Animal.

Orientadora: Paula Alessandra Di Filippo

Campos dos Goytacazes

2023

LAURA BRAVO DEFANTI VENÂNCIO PETRUCCI

**EFEITO DO LAVADO UTERINO COM RINGER COM LACTATO OZONIZADO NO
TRATAMENTO DE ENDOMETRITES EM ÉGUAS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na Área de Concentração de Reprodução e Saúde Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Ana Bárbara Freitas Rodrigues (UENF)

Prof. Dr^a. Fernanda Saules Ignácio (EDUVALE)

Dr^a Francielli Pereira Gobbi (AMAN)

Prof. Dr^a. Paula Alessandra Di Filippo (UENF)
(Orientadora)

Aos meus pais, José Luiz e Márcia, que sempre me incentivaram chegar até aqui.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, José Luiz e Márcia, e avó Zilda, a quem dedico essa e todas as minhas conquistas.

As minhas irmãs Livia e Patrícia, pelo exemplo de companheirismo ao longo desses anos. Vocês são a prova de que para ser família a distância física não importa. Ao meu sobrinho Diogo.

À toda minha família, tios, primos que me apoiaram e de alguma forma me ajudaram a tornar esse sonho em realidade.

À minha orientadora Paula Alessandra Di Filippo, pela confiança em mim depositada quando aceitou me orientar, por todos os ensinamentos passados. Sou grata pelo exemplo de ética e dedicação profissional. Agradeço pela paciência e disponibilidade. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos e companheiros que de alguma forma fizeram esse experimento acontecer: Luiza Feitosa, Andressa Alves, João Vitor Bersot, Maurício Mata, Maurício Neto, Caroline Fabres, Isadora Guterrez, Ludmila Audízio, Letícia Cirne. Sem dúvidas, sem a presença e apoio de vocês nada aconteceria.

À Francielli e Gabi por todos os conhecimentos passados ao longo do tempo, por mais distantes que estejam, vocês sempre se fazem presentes.

À todos os funcionários do Setor de Grandes Animais da UENF, pela parceria e sempre dispostos a ajudar em qualquer necessidade.

Ao Setor de Microbiologia do Hospital Veterinário da UENF e sua equipe, pela ajuda, paciência e todos os conhecimentos passados durante esse período.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelo acolhimento de todos esses anos.

À Deus, sem ele eu não estaria aqui. A vocês o meu MUITO OBRIGADA!

*É preciso que eu suporte duas ou três larvas
se quiser conhecer as borboletas.*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A endometrite é um processo inflamatório frequente no útero das éguas, interferindo negativamente na eficiência reprodutiva do rebanho, causada principalmente pela limpeza ineficiente do útero na remoção de agentes invasivos como bactérias, espermatozoides e subprodutos inflamatórios. O uso de infusões da solução de ringer lactato é uma prática rotineira nas biotecnologias da reprodução equina. Diante disso, objetivou-se avaliar o efeito da lavagem uterina com solução ringer com lactato ozonizada em éguas com endometrite. Foram utilizadas dezoito éguas das raças Mangalarga Marchador, Quarto de Milha e mestiças, sendo 1 doadora e 17 receptoras de embriões, com histórico de subfertilidade, dificuldade pra emprenhar, com presença de líquido uterino e receptoras de embriões que obtiveram 2 ou mais diagnósticos negativos de gestação após transferência de embrião. As éguas selecionadas foram acompanhadas durante dois ciclos estrais consecutivos e separadas em dois grupos, o grupo controle GRL (n=9) recebeu o tratamento de lavagem uterina com soro ringer lactato sem a utilização do Ozônio; o grupo GO (n=9) recebeu o tratamento de lavagem uterina com soro ringer lactato, na concentração de 50 mcg durante 10 minutos. Os exames de citologia, cultura microbiológica e biópsia uterina foram coletados antes e após os tratamentos para a avaliação dos resultados. Após o tratamento, observou-se que 9 (100%) animais do GRL permaneceram com o exame citológico positivo e no GO 6 (66,6%) animais obtiveram citologia negativa. No GO, 3 (33,3%) animais não apresentaram alteração no grau de inflamação e 6 (66,6%) apresentaram melhora, com a diminuição da resposta inflamatória, determinada pela queda do número de neutrófilos. Na análise de cultura bacteriana pós-tratamento, identificou que no GO 77,7% (7/9) dos animais não foram observados crescimento bacteriano e 22,2% (2/9) dos animais mantiveram-se com exame de cultura positivo. No exame histológico, não houve diferença estatística entre os grupos após tratamento ($P>0,05$). Portanto, conclui-se que o tratamento com ozônio reduz a contagem de PMNs e foi eficaz nas endometrites infecciosas causadas por bactérias gram negativas.

Palavras-chave: bactéria, equino, infecção uterina, ozônio, terapia.

ABSTRACT

Endometritis is a frequent inflammatory process in the uterus of mares, negatively interfering with the reproductive efficiency of the herd, mainly caused by inefficient cleaning of the uterus in removing invasive agents such as bacteria, sperm and inflammatory by-products. The use of lactated Ringer's solution infusions is a routine practice in equine reproduction biotechnologies. Therefore, the objective was to evaluate the effect of uterine lavage with ozonated lactated Ringer's solution in mares with endometritis. Eighteen mares of the Mangalarga Marchador, Quarter Horse and crossbred breeds were used, 1 donor and 17 recipients of embryos, with a history of subfertility, difficulty getting pregnant, with the presence of uterine fluid and recipients of embryos that obtained 2 or more negative diagnoses of pregnancy after embryo transfer. The selected mares were monitored during two consecutive estrous cycles and separated into two groups, the control group GRL (n=9) received the treatment of uterine lavage with lactated ringer serum without the use of ozone; the GO group (n=9) received uterine lavage treatment with ringer lactate serum at a concentration of 50 mcg for 10 minutes. Cytology exams, microbiological culture and uterine biopsy were collected before and after treatments to evaluate the results. After the treatment, it was observed that 9 (100%) animals from the GRL remained with the positive cytological exam and in the GO 6 (66.6%) animals obtained negative cytology. In GO, 3 (33.3%) animals showed no change in the degree of inflammation and 6 (66.6%) showed improvement, with a decrease in the inflammatory response, determined by the decrease in the number of neutrophils. In the post-treatment bacterial culture analysis, it was identified that in GO 77.7% (7/9) of the animals did not observe bacterial growth and 22.2% (2/9) of the animals remained with a positive culture test. In the histological examination, there was no statistical difference between the groups after treatment ($P>0.05$). Therefore, it is concluded that ozone treatment reduces PMNs count and was effective in infectious endometritis caused by gram negative bacteria.

Keywords: equine, uterine infection, ozone, bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Porcentagem dos agentes etiológicos encontradas no exame de cultura microbiológica no pré-tratamento: 17 % Sthaphylococcus sp., 11% Streptococcus sp., 5% Corynebacterium, 39% Escherichia coli, e 28% Pseudomonas.45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado do exame citológico antes e após tratamento.	42
Tabela 2- Frequências observadas no exame citológico para classificação das endometrites de acordo com a porcentagem de PMN's antes e após tratamento.	43
Tabela 3: Resultados obtidos através da cultura microbiológica, especificando os agentes etiológicos e a caracterização do "gram", antes e após o tratamento.	44
Tabela 4: Resultados referentes ao exame de citologia e cultura bacteriana dos grupos GRL e GO antes do tratamento.....	47
Tabela 5: Frequências observadas nos achados histológicos, classificados segundo Schoon et al. (192).	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ABOZ - Associação Brasileira de Ozonioterapia

EPPC - Endometrite Persistente Pós Cobertura

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-10 - Interleucina 10

IL-3 - Interleucina 3

IL-4 - Interleucina 4

Kg - Quilograma

mL - Miligramas

LBV - Lavado de Baixo Volume

LRS - Solução Ringer com Lactato

LTB4 - Leucotrieno 4

MCE - Metrite Contagiosa Equina

NK - Células natural Killers

NO - Óxido Nítrico

NOs - Óxido Nítrico sintetase

O3 - Ozônio

PAMP's – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PgE2 - Prostaglandina E

PgF2 α - Prostaglandina

PMNs - Polimorfonucleares

PPM - Pesquisa da Pecuária Municipal

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTIVO DA ÉGUA	16
3.2	MECANISMOS DE DEFESA UTERINA.....	17
3.2.1	Barreiras Físicas	17
3.2.2	Limpeza Física e Mecânica do Útero.....	18
3.2.3	Mecanismos Celulares e Imunológicos de Defesa do Útero.....	19
3.3	ENDOMETRITES.....	21
3.3.1	Classificação da Endometrites.....	22
3.3.2	Endometrite Infeciosa Crônica	22
3.3.3	Endometrite Fúngica	23
3.3.4	Endometrite Persistente Pós-Cobertura (EPPC)	24
3.3.5	Endometrite Crônica Degenerativa	26
3.3.6	Endometrite Sexualmente Transmissível.....	26
3.4	DIAGNÓSTICO	27
3.4.1	Cultura Microbiológica de Lavados Uterinos.....	27
3.4.2	Citologia Uterina	29
3.4.3	Histologia Endometrial	31
3.5	TRATAMENTOS	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	PERÍODO E LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	36
4.2	AMOSTRAGEM	36
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
4.4	COLETA DE LAVADO UTERINO	38
4.5	BIOPSIA UTERINA	39
4.6	LAVAGENS UTERINAS.....	40
5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
6	RESULTADOS E DUSCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	50
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

A equinocultura tem se mostrado uma atividade crescente na economia brasileira movimentando bilhões de reais, gerando emprego e renda. Segundo Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o rebanho equino no Brasil cresceu 1,9% no ano de 2020 em comparação aos anos anteriores somando 6 milhões de animais (IBGE, 2020; PPM, 2020).

Para obter êxito na produção de equinos, faz-se necessário que as matrizes e reprodutoras disponham de boa fertilidade, principal característica fisiológica no ponto de vista econômico. No entanto, a fertilidade das éguas pode ser afetada por múltiplos fatores, principalmente por patologias no sistema reprodutivo (VOSS, 1984). Das afecções que acometem o trato reprodutivo, a endometrite é a maior causa de infertilidade nas éguas (BRINSKO et al., 2011), sendo apontada como a terceira afecção clínica mais comum nos equinos, após a síndrome cólica e afecções do trato respiratório (TROEDSSON, 1999).

A endometrite é um processo inflamatório frequente no útero das éguas, interferindo negativamente na eficiência reprodutiva do rebanho, diminuindo os índices de prenhez, aumentando a ocorrência de repetição de cio e o intervalo entre partos (RORATTO; BELTRAN, 2009). A maior causa de endometrite é devido à limpeza ineficiente do útero na remoção de agentes invasivos como bactérias, espermatozoides e subprodutos inflamatórios (GALHÓS, 2018), podendo ocorrer em éguas susceptíveis ou éguas com idade avançada, nas quais muitas vezes esse fator está correlacionado com a posição do útero e retardo na eliminação de fluidos uterinos após a cobertura, causando a infertilidade. A vulva, o complexo vestibulo-vaginal e a cérvix são barreiras mecânicas, embora a fossa do clitóris e a vagina são consideradas reservatórios de bactérias (DASCANIO, 2011; PAPA et al., 2014).

Devido à alta prevalência e importância das endometrites no sistema de produção de equinos, as alternativas para tratamento desta patologia têm sido muito estudadas (SCOGGIN, 2016). Para tratar o processo patológico preconiza-se o uso de antimicrobianos, anti-inflamatórios, lavagens uterinas (CANISSO et al., 2020) que podem ser associados às terapias alternativas como administração de agentes

mucolíticos (GORES-LINDHOLM et al, 2013), compostos quelantes (BUCZKOWSKA et al, 2015), plasma rico em plaquetas autólogo, acupuntura (SCOGGIN, 2016) e recentemente a ozonioterapia (HEREDIA, 2013).

A ozonioterapia tem sido frequentemente utilizada na medicina veterinária no tratamento de doenças uterinas como metrite, endometrite, retenção de placenta, vaginite, urovagina e mastites (SAMARDŽIJA et al. 2017; VILA, 2020). Têm demonstrado resultados positivos em éguas com falhas reprodutivas, no qual, 6 éguas engravidaram após tratamento com lavagens uterinas utilizando água ozonizada (HEREDIA, 2013). A ozonioterapia mostrou resultados muito promissores no tratamento de distúrbios puerperais em vacas, cabras e ovelhas como alternativa no uso de antibióticos (ĐURIČIĆ et al. 2016).

Além de possuir ação antimicrobiana, o ozônio possui grande potencial na melhora do sistema imunológico (ĐURIČIĆ, et al. 2015), na via intrauterina, induz o estresse oxidativo sistêmico em éguas, evidenciado pela diminuição da capacidade antioxidante total e aumento da capacidade oxidante total (ALMEIDA et al., 2021) e não acarreta resistência bacteriana, além de ser um tratamento de baixo custo (VILA, 2020). O uso de infusões da solução de ringer lactato é uma prática rotineira nas biotecnologias da reprodução equina. Diante disso, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito da lavagem uterina com solução ringer com lactato ozonizada em éguas com endometrite.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito das lavagens uterinas com solução ringer com lactato ozonizada no endométrio de éguas doadoras e receptoras subférteis e/ou com histórico de endometrites persistentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar o efeito das múltiplas lavagens uterinas de solução de ringer com lactato ozonizada com altas concentrações de O₃, nas contagens de células polimorfonucleares, crescimento bacteriano e/ou fúngico e integridade endometrial.

b) Testar a hipótese se múltiplas lavagens uterinas de solução de ringer com lactato ozonizada reduzirá a contagem de células polimorfonucleares, cessará o crescimento bacteriano e/ou fúngico e se a integridade endometrial retornará à normalidade em função do tempo de tratamento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTIVO DA ÉGUA

O sistema reprodutivo das éguas assemelha-se às demais espécies dos animais domésticos, porém com algumas particularidades referentes ao tamanho, posicionamento e estrutura micro e macro anatômica (PAIVA JÚNIOR, 2008). São constituídos pelos ovários, ovidutos ou tubas uterinas, útero, cérvix uterina, vagina e genitália externa que compreende o vestíbulo e a vulva. Os órgãos genitais internos são suspensos pelo ligamento largo, que coletivamente é composto pelo mesovário, mesossalpinge e o mesométrio, que sustentam os ovários, os ovidutos e o útero, respectivamente (HAFEZ et al., 2004; FRANDSON et al., 2014).

O útero é um órgão tubular oco, composto por dois cornos uterinos, um corpo e uma cérvix, na sua porção cranial projetam-se as tubas uterinas e na parte caudal a vagina. É formado por três camadas, o endométrio (mucosa), o miométrio (muscular) e o perimétrio (serosa). Está inserido na região sublombar e nas paredes laterais da cavidade pélvica pelos ligamentos largos. Nos equinos, os cornos possuem cerca de 25 cm de comprimento, localizam-se estritamente na cavidade abdominal e são distantes entre si. (DYCE et al., 2010; SILVA, 2020). O corpo do útero possui cerca de 20 cm de comprimento, situa-se na cavidade abdominal e uma parte entende-se para a cavidades pélvica (DYCE et al., 2010). Os cornos uterinos são desenvolvidos a partir dos dutos paramesonérficos direito e esquerdo, e o corpo é formado pela fusão destes dutos deixando uma única cavidade (SILVA, 2020).

A cérvix é uma estrutura semelhante a um esfíncter, que se projeta caudalmente na vagina e controla o acesso ao útero (HAFEZ et al., 2004; KONIG et al., 2016). É composta principalmente por tecido conjuntivo com pequenas quantidades de tecido muscular liso, caracterizada por uma espessa parede e por um lúmen constrito. Na égua, a cérvix tem aproximadamente de 5 – 7,5 cm de comprimento, apresenta saliências e aparência lobuladas, caracterizadas pelas dobras da mucosa e as alças que se projetam para o interior da vagina (HAFEZ et al., 2004).

A cérvix permanece predominantemente fechada, exceto durante o cio (estro), quando relaxa suavemente, permitindo a entrada dos espermatozoides no útero. O muco produzido pela cérvix, na qual forma um tampão que auxilia o fechamento do

canal cervical é facilmente expelido pela vulva durante o cio e o parto (HAFEZ et al., 2004; KONIG et al., 2016).

A vagina é a parte cranial do órgão copulatório feminino, que compreende a desde o óstio uterino externo até o óstio externo da uretra. Sua maior parte encontra-se na região retroperitoneal, embora suas partes craniais sejam cobertas por peritônio. Na égua, o colo pronunciado restringe o lúmen da parte cranial da vagina a um espaço anular, conhecido como fórnice. O vestíbulo da vagina é a parte caudal do órgão copulatório, se prolonga desde o óstio externo da uretra até a vulva externa e combina funções reprodutoras e urinários (KONIG et al., 2016).

A vulva é formada por dois lábios. A comissura dorsal é arredondada e a comissura ventral é aguda, na égua, esse padrão é invertido. De forma análoga ao pênis, o clitóris pode ser dividido em dois segmentos, um corpo e uma glande. O clitóris se situa em uma fossa amplamente coberta por uma prega mucosa, o equivalente feminino do prepúcio. Ele se torna bastante proeminente na égua durante o cio, quando é exposto pelos movimentos dos lábios. Na égua, vários seios clitorianos invadem a glande, o que pode abrigar os organismos responsáveis por metrite equina contagiosa (HAFEZ et al., 2004; KONIG et al., 2016).

3.2 MECANISMOS DE DEFESA UTERINA

O útero da égua é considerado um ambiente estéril, mantido livre de contaminantes por meio de barreiras físicas, sistema imunológico e sistema linfático funcional (LeBLANC, 2003). As barreiras físicas que inibem o acesso de microrganismos através da entrada de ar, material fecal e urina ao útero são a vulva, o esfíncter vestíbulo-vaginal e a cérvix (FERRIS, 2017a).

3.2.1 Barreiras Físicas

Nas éguas, independentemente do método de cobertura, o sêmen é depositado diretamente na luz uterina. Neste instante, as barreiras físicas são ultrapassadas, sendo o espermatozoide, as proteínas do plasma seminal, as bactérias presentes no sêmen e no pênis do garanhão, responsáveis pela indução de uma resposta

inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997). As deformidades na conformação perineal interferem nas barreiras que separam o ambiente uterino do meio exterior, podendo ocasionar processos patológicos, como pneumovagina, expondo excessivamente o útero a agentes contaminantes e irritantes e favorecendo a instalação de processos infecciosos e inflamatórios (CASLICK 1937; CAMOZZATO, 2010). Éguas com lacerações ou aderências na cérvix, com conformação vulvar anormal, pólipos vaginais, lacerações perineais, fístulas retovaginais, entre outros, estão mais predispostas a adquirirem infecções uterinas persistentes, dificultando a limpeza mecânica do útero durante o estro, acarretando acúmulo excessivo de líquido durante o diestro e impedindo o fechamento adequado da cérvix, impossibilitando a manutenção da gestação (CAMOZZATO, 2010; CARMONA, 2011).

3.2.2 Limpeza Física e Mecânica do Útero

Um método importante para a rápida eliminação do agente agressor e dos componentes e subprodutos inflamatórios é a contratilidade do miométrio, que é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (EVANS et al., 1987). Durante o estro, a atividade de contratilidade ocorre por períodos de aproximadamente 5 minutos, sendo alternados por períodos equivalentes de repouso (JONES et al., 1991). A resposta à agressão ocorre rapidamente, com um aumento da intensidade das contrações e o desempenho deste processo requer funcionalidade eficiente da cérvix (LEBLANC et al., 1989).

As contrações do miométrio facilitam a drenagem ao comprimir os vasos linfáticos, movendo os fluídos em direção ao linfonodo (GUYTON, 1991). A limpeza física do útero tem um papel fundamental na patogenia da endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON, 1997). As contrações miometriais das éguas resistentes tendem a ocorrer em direção à cérvix, facilitando a eliminação do conteúdo acumulado no lúmen uterino, enquanto nas éguas susceptíveis, as contrações ocorrem na direção oposta, inviabilizando a eliminação do conteúdo (REITZENSTEIN et al., 2002). Éguas com endometrites persistentes pós-cobertura (EPPC) apresentam contrações uterinas mais longas e mais intensas do que as éguas que têm a limpeza uterina normal, e as principais causas da EPPC são as falhas na atividade mioelétrica, liberação hormonal e modificações anatômicas uterinas (TROEDSSON, 1999).

Pode-se afirmar que a limpeza física do útero é mais eficiente durante o estro, uma vez que este representa o momento do ciclo estral em que a cérvix encontra-se relaxada (CARMONA, 2011), no entanto, a limpeza ineficiente do útero durante este período, é a maior causa de endometrite recorrente na égua, no qual, animais idosos e com susceptibilidade apresentam disfunção mecânica na limpeza de subprodutos do útero e acumulam fluidos após inoculação de bactérias durante o estro (TROEDSSON, et al., 1993). Durante o diestro, quando a cérvix está fechada, é provável que os vasos linfáticos façam a reabsorção de fluido ou partículas remanescentes no útero (LEBLANC et al., 1995). Entretanto, para que a drenagem linfática exerça sua função, é fundamental uma boa contratilidade miometrial (MALSCHITZKY et al., 2007)

São necessários mais estudos para determinar se a disfunção miometrial se deve a redução do aporte sanguíneo do miométrio, a disfunção contráctil devido a alterações endócrinas ou moleculares, a diminuição da drenagem linfática ou se deve simplesmente ao fato das éguas mais velhas sofrerem inevitavelmente, devido às múltiplas gestações ou desvio crânio-ventral do trato reprodutivo (TROEDSSON, 1999).

3.2.3 Mecanismos Celulares e Imunológicos de Defesa do Útero

Em situações em que o útero é exposto a agentes invasivos, ocorre ativação do sistema imune inato. Moléculas que, comumente são encontradas na superfície dos microrganismos, constituem Padrões Moleculares associados a Patógenos (PAMP's) que ao se ligarem às imunoglobulinas produzidas pela mucosa uterina, ativam o sistema complemento pela via clássica através de C3 e C5 (TROEDSSON, et al., 1997). Quando ocorre a ativação do sistema complemento, há estímulos para formação de leucotrienos, prostaglandina E (PgE), prostaglandina F_{2α} (PgF_{2α}) e outros derivados do ácido araquidônico que atuam como agentes quimiotáxicos para neutrófilos (PYCOCK; ALLEN, 1990).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico e migram do vaso sanguíneo para o tecido adjacente e, dele, para o processo inflamatório (CAMOZZATO, 2010). Sendo a célula mais importante na defesa do útero, o neutrófilo encontra-se presente na luz uterina cerca de 30 minutos após contaminação,

atingindo o pico inflamatório em 12 horas (KATILA, 1995, TROEDSSON, 1997). Deficiências na produção, migração, ingestão e lise intracelular dos neutrófilos podem ser a causa de infecções bacterianas resistentes a tratamentos (BRENNEIS; HANSCH, 1993).

Apesar das bactérias serem o foco da maior parte dos estudos sobre a patogenia da endometrite, o espermatozoide é considerado o principal causador da inflamação que ocorre após a cobertura, e 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).

O aumento da produção de óxido nítrico (NO) pelo endométrio de éguas susceptíveis após a inseminação, é descrito como causa na diminuição na 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), que são moléculas com potentes efeitos antimicrobianos, sendo responsável pela lise de bactérias no interior do neutrófilo (MACKAY, 2000). Porém, o óxido nítrico tem um efeito inibitório, dose dependente, 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 em relação as éguas resistentes. Concentrações aumentadas de óxido nítrico 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).

Os eicosanoides, como a prostaglandina F₂α (PgF₂α) e o leucotrieno B₄ (LTB₄), são conhecidos por terem efeitos benéficos para a integridade uterina. Já a prostaglandina E (PgE₂) é responsável pelo efeito inibitório da função imunitária uterina, particularmente, função dos polimorfonucleares (PMNs). A PGF₂α, além de induzir alterações na permeabilidade vascular e estimular a contratilidade uterina, induz a luteólise. Este fenômeno causa uma redução da concentração de

progesterona circulante, reduzindo o seu efeito imunossupressor sobre as defesas imunitárias uterinas (LEWIS, 2004).

Os hormônios predominantes 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 estudo, as éguas tratadas com progesterona não foram capazes de combater os agentes invasivos e grande volume de conteúdo infeccioso acumulou-se no útero (EVANS et al., 1986). Sob ação da progesterona ocorre dominância das células TH2 no qual os linfócitos periféricos produzem um fator imunomodulatório que determina a secreção de interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), diminuindo a ação das células natural killers (NK), que reconhecem células estranhas no organismo, inibindo as citocinas TH1, perfil pró inflamatório, como o interferon- γ , denominado fator de ativação de macrófagos (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).

3.3 ENDOMETRITES

A endometrite é um processo inflamatório frequente no útero das éguas, interferindo negativamente na eficiência reprodutiva do rebanho, diminuindo os índices de prenhez, aumentando a ocorrência de repetição de cio e o intervalo entre partos (RORATTO; BELTRAN, 2009). A maior causa de endometrite é devido à limpeza ineficiente do útero na remoção de agentes invasivos como bactérias, espermatozoides e subprodutos inflamatórios (GALHÓS, 2018), podendo ocorrer em éguas susceptíveis ou éguas com idade avançada, nas quais muitas vezes esse fator está correlacionado com a posição do útero e retardo na eliminação de fluidos uterinos após a cobertura, causando a infertilidade. A vulva, o complexo vestibulo-vaginal e a cérvix são barreiras mecânicas, embora a fossa do clitóris e a vagina são consideradas reservatórios de bactérias (DASCANIO, 2011; PAPA et al., 2014).

O comprometimento uterino, muitas vezes, pode estar relacionado à presença de bactérias aeróbicas, que, devido a defeitos na conformação perineal, podem resultar em pneumovagina e urovagina, e quando existem fezes acumuladas na região vulvar, estas são também aspiradas para a vagina, ocasionando a contaminação fecal (LEBLANC; MCKINNON 2011; PAPA et al., 2014). A exposição ao pênis e ao sêmen do garanhão também promovem a entrada de bactérias no trato reprodutivo, assim como a infusão de substâncias inadequadas no útero, causando processos irritativos e infecciosos (BRINSKO et al., 2011).

As éguas podem ser divididas em dois grupos, as suscetíveis e as resistentes, conforme a capacidade dos neutrófilos fagocitarem os agentes bacterianos e a capacidade de sua musculatura uterina eliminar mecanicamente o conteúdo em até 96 horas (WATSON, 1988). As éguas suscetíveis são aquelas que têm propensão para desenvolver endometrite persistente, especialmente devido à dificuldade na eliminação de subprodutos da inflamação e detritos, após o parto ou cobrição. As éguas resistentes são aquelas que respondem à invasão bacteriana com mecanismo altamente eficiente e conseguem executar uma rápida e eficaz depuração do útero (ASBURY et al., 1982; LEBLANC; CAUSEY, 2009).

3.3.1 Classificação da Endometrites

As endometrites podem ser de caráter subclínica, podendo ocorrer no pós-parto, ou ainda mais específica, classificada de acordo com a etiologia e fisiopatologia como infecciosa crônica, fúngica, persistente pós-cobertura, crônica degenerativa ou causada por bactérias sexualmente transmissíveis (FACTOR, 2019). Essas categorias não são absolutas, algumas éguas podem mudar de categoria entre uma estação e outra, até mesmo dentro da mesma estação de monta ou podem se ajustar em mais de uma categoria (WATSON, 2000).

3.3.2 Endometrite Infecciosa Crônica

A endometrite infecciosa é a principal causa de subfertilidade em equinos e está mais associada a bactérias aeróbicas, no entanto, bactérias anaeróbicas também podem invadir o útero (WINGFIELD-DIGBY; RICKETTS, 1982; RICKETTS; MACKINTOSH, 1987; RIDDLE et al., 2007). As bactérias normalmente isoladas em

éguas com infecção uterina são *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* (NIELSEN et al., 2010; TROEDSSON, 2011). Outras bactérias aeróbias isoladas incluem *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Actinobacter* spp., *Proteus* spp. e *Citrobacter* spp. (TROEDSSON, 2011).

Entre as bactérias supracitadas, *Streptococcus zooepidemicus* e *Escherichia coli* são as maiores causadoras de endometrite aguda e crônica, respectivamente (ALBIHN et al., 2003; FRONTOSO et al., 2008). É importante ressaltar que o *Streptococcus zooepidemicus* também demonstrou causar infecções latentes e profundas no endométrio das éguas, tornando-as resistentes às terapias tradicionais (PETERSEN et al., 2015).

Nas inflamações crônicas há perda do epitélio e da camada de muco protetora, favorecendo a aderência das bactérias à mucosa (CAUSEY et al., 2008). As diversas bactérias, expressam diferentes fatores de virulência e formas de invadir o sistema imunitário, resultando numa vasta diversidade de sinais clínicos, ultrassonográficos e achados laboratoriais (LEBLANC, 2010).

3.3.3 Endometrite Fúngica

A endometrite infecciosa apresenta origem bacteriana na maioria das vezes, no entanto, os fungos leveduriformes e menos frequente os filamentosos, são potencialmente patogênicos para o endométrio das éguas (GHASEMZADEH-NAVA et al., 2004; LEBLANC, 2008). As endometrites fúngicas podem ter ocorrência solo ou estarem associadas às bactérias (DASCANIO et al., 2010). Os fungos mais comumente isolados nas endometrites são *Candida* spp., principalmente a *Candida albicans* (DASCANIO et al., 2001; AMARAL et al., 2007), porém fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Trichosporon* também podem estar relacionados (AMARAL et al., 2007).

A maior parte da endometrites fúngicas são crônicas, diagnosticadas em éguas susceptíveis a endometrites persistentes, isto é, naquelas que apresentam falhas físicas, imunológicas ou linfáticas nos mecanismos de defasa uterino (FUMUSO et al., 2007; BUCCA et al., 2008). Entretanto, casos agudos podem acontecer

principalmente após abortos com etiologia micótica (LANGONI, 1995; PETRITES-MURPHY et al., 1996). Os fatores predisponentes para essa infecção, incluem imunossupressão, desnutrição, trauma tecidual, disfunções endócrinas, como distúrbios da hipófise equina, alterações fisiológicas associadas à prenhez ou crescimento e alterações induzidas por antimicrobianos e terapia com drogas imunossupressoras. Especificamente, antibióticos, corticosteróides e agentes quimioterápicos têm sido implicados na alteração da função imunológica levando a infecções fúngicas oportunistas (DASCANIO, 2007).

Nas últimas décadas houve um aumento nos casos de endometrites fúngicas (LIU; TROEDSSON, 2008; FERRIS et al., 2013). Tal fato pode ser atribuído à maior exposição das éguas a fatores predisponentes para a colonização fúngica como tratamentos intrauterinos com antibióticos (CARTER; CHENGAPPA, 1995; ALVARENGA, 2008) intensa manipulação genital e administração prolongada de progesterona e/ou hormônios corticoides, como ocorre nas fêmeas em programas de transferência de embriões, enfermidades cervicais e auto contaminação fecal devido à má-conformação vulvar (HINRICHS et al., 1992; NICO et al., 1994; LEBLANC, 2008; LIU; TROEDSSON, 2008).

Encontram-se dificuldades em fazer um diagnóstico preciso da endometrite fúngica. Vários fatores contribuem para isso, como a falta de direcionamento de material uterino para a cultura fúngica em meios específicos, demora no crescimento das colônias fúngicas, necessidade de colorações especiais que facilitam a visualização do fungo na amostra de tecido (AMARAL et al., 2007/ ALVARENGA, 2008).

3.3.4 Endometrite Persistente Pós-Cobertura (EPPC)

A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) é a causa mais comum da afecção em éguas e ocorre geralmente após a cobertura. Após a introdução de espermatozoides no útero da égua, ocorre um processo inflamatório passageiro no endométrio, com o intuito de remover do útero o excesso de espermatozoides, espermatozoides defeituosos ou mortos, plasma seminal e outros agentes contaminantes (TROEDSSON, 1999). Esse processo deve ser fisiologicamente cessado em até 96 horas, pois o lúmen uterino deve estar preparado para receber o

embrião no 5° ou 6° dia após a fertilização. Se a égua for susceptível ou apresentar afecção, será incapaz de superar o processo inflamatório, afetando negativamente as taxas de prenhez (LEBLANC; CAUSEY, 2009; BRINSKO et al., 2011).

As éguas resistentes à EPPC são capazes de ativarem os neutrófilos e fagocitarem os agentes bacterianos e em conjunto com a contração miometrial, eliminarem mecanicamente o fluido espermático, tornando este mecanismo altamente eficiente, junto com o plasma seminal, contribuindo para o transporte e sobrevivência dos espermatozoides viáveis, assim como para eliminarem os não viáveis; modelando desta forma a resposta inflamatória, o que não ocorre em éguas susceptíveis (FACTOR, 2019).

Éguas susceptíveis são caracterizadas por serem incapazes de eliminar o processo inflamatório em até 96 horas após a cobertura. Geralmente estas éguas apresentam algumas características em comum como a idade avançada, histórico de endometrites e falhas reprodutivas em algumas estações de monta (TROEDSSON, 1997). Apresentam ambiente uterino desfavorável à gestação, com manutenção de edema uterino durante 3-5 dias após a inseminação, podendo ocorrer liberação constante de prostaglandina devido à inflamação, levando à luteólise e baixas concentrações de progesterona para manutenção da prenhez (CAUSEY, 2006; TROEDSSON, 2006; LEBLANC; CAUSEY, 2009).

As éguas susceptíveis à EPPC são predispostas a desenvolverem infecções crônicas em decorrência da capacidade das bactérias e dos fungos produzirem biofilme (FERRIS, 2014; BEEHAN et al., 2015; FERRIS, 2017). O biofilme é um agregado complexo de microrganismos e suas secreções, substâncias poliméricas extracelulares (STOODLEY et al., 2002), conferem a habilidade dos microrganismos evadirem o sistema imune (JENSEN et al., 1990; MUSTOE, 2004; SHAH et al., 2006; THURLOW et al., 2011). O biofilme funciona como uma barreira para a difusão dos antimicrobianos, com sua penetração limitada, resulta em resistência à terapia antimicrobiana, particularidade quando comparada à infecção por bactérias planctônicas (BROWN et al., 1988; ANWAR et al., 1992; MAH e O'TOOLE, 2001).

3.3.5 Endometrite Crônica Degenerativa

A endometrite crônica degenerativa, também conhecida como endometrose, é definida como uma fibrose periglandular e estromal ativa ou inativa, incluindo alterações glandulares com lacunas fibróticas (MOREIRA, 2011). Esta afecção pode ser caracterizada por alterações crônicas e degenerativas do endométrio como fibrose periglandular, estase linfática e dilatação glandular e o primeiro sinal da endometriose é a morfologia atípica e diferenciação funcional das células do estroma endometrial periglandular (BRITO; BARTH, 2003).

A endometrose pode ocorrer em função da idade, uma vez que vem sendo observada em éguas idosas sem histórico de endometrites, sugerindo que a fibrose degenerativa do endométrio pode ser resultante do envelhecimento ao invés do processo inflamatório (BRITO; BARTH, 2003). Este processo pode ser agravado nas éguas múltiparas. Sucessivas endometrites agudas e o uso de agentes irritantes em infusões uterinas também podem provocar a endometrose (CAMOZZATO, 2010).

Quando há lesão tecidual, a persistência de neutrófilos pode ocasionar uma inflamação crônica, gerando a fibrose pela ativação de miofibroblastos (CHRYSANTHOPOULOU et al., 2014). Ao contrário do que acontece nos casos de inflamação, a fibrose representa uma alteração permanente e sem resolução clínica (DASCANIO; MCCUE, 2014), sendo diagnosticado por meio de biópsia endometrial e classificada de acordo com o grau de fibrose (LEHMANN et al., 2011).

3.3.6 Endometrite Sexualmente Transmissível

A endometrite contagiosa equina é uma doença sexualmente transmissível, também conhecida por metrite contagiosa equina (MCE) é causada pelas bactérias *Taylorella equigenitalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (TROEDSSON, 1997). A bactéria *Taylorella equigenitalis* é altamente contagiosa, patogênica e de declaração obrigatória à OIE (OIE,2012).

A transmissão ocorre, principalmente, através do coito, porém pode ocorrer pela inseminação artificial ou por vetores mecânicos. Os garanhões são carreadores assintomáticos e a bactéria pode persistir por meses ou anos na superfície do pênis e

no esmegma do prepúcio. As éguas contaminadas apresentam a bactéria na região do clitóris, e normalmente desenvolvem sintomatologia após 10 a 14 dias após a cobertura, apresentando desde uma endometrite leve, até uma secreção mucopurulenta severa e uma infertilidade temporária, podendo ocorrer casos de aborto. Algumas éguas podem ser assintomáticas e apresentarem apenas redução na fertilidade. Os potros podem se contaminarem no nascimento e se tornarem portadores assintomáticos por longos períodos (MOREIRA, 2011). O diagnóstico é baseado na sintomatologia clínica e pelo isolamento das bactérias no trato reprodutivo da égua (CAMOZZATO, 2010).

3.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das endometrites baseia-se numa abordagem multimodal incluindo histórico clínico e reprodutivo detalhado. Palpação transretal com auxílio da ultrassonografia, cultura bacteriológica e fúngica, citologia endometrial e biopsia uterinas (AMORIM et al., 2016) são os exames mais utilizados para diagnosticar endometrite em éguas (NIELSEN, 2005).

A interpretação dos achados bacteriológicos associados com os citológicos são importantes, pois asseguram a existência de uma infecção em decorrência da presença de neutrófilos no exame citológico. A presença de neutrófilos tem maior relevância que a identificação de bactérias, já que existe uma flora bacteriana normal nos tratos reprodutivos do garanhão e da égua (HAFEZ, et al., 2004). Para confiabilidade das análises laboratoriais é preciso eficácia na obtenção das amostras endometriais submetidas à citologia, cultura e/ou avaliação histopatológica (FACTOR, 2019).

3.4.1 Cultura Microbiológica de Lavados Uterinos

A cultura uterina deve ser realizada previamente ao exame citológico ou biópsia, para a obtenção de amostras livre de contaminação iatrogênica, com o intuito de examinar o crescimento microbiológico de fungos e bactérias. Pode ser feita com o *swab*, pelo lavado uterino de baixo volume ou pela biópsia (NIELSEN et al., 2012).

A técnica do lavado de baixo volume (LBV) foi descrita em 1988, com a finalidade de ser utilizada para os exames de cultura e citologia uterina (BALL, 1988). Esta técnica, consiste na infusão de um pequeno volume de solução estéril (60 a 150 mL) no útero através de uma sonda estéril (LEBLANC et al., 2007). Após a infusão, o fluido é distribuído por todo o útero através da manipulação transretal uterina e o efluente é então coletado por fluxo gravitacional ou sucção, podendo ser auxiliado por administração intravenosa de ocitocina. O efluente é centrifugado e o *pellet* sedimentado é submetido as avaliações (LINTON; SERTICH, 2016).

A técnica de LBV permite a avaliação do efluente resultante do lavado, diminuindo a taxa de falsos positivos se houver associação de testes adicionais que possam indicar a inflamação, tais como, a aparência de efluente, o pH e/ou a presença de detritos, o que aumenta ainda mais a sensibilidade deste método de diagnóstico (LEBLANC et al., 2007; COCCHIA et al., 2012). Quanto à celularidade e a presença de secreção ou muco, o efluente pode ser classificado em normal, quando límpido e translucido, ou anormal, quando turvo, purulento ou com presença de muco (LEBLANC et al., 2007).

A vantagem da técnica de LBV, é permitir a amostragem de uma área maior do endométrio, mais representativa do que os coletores comerciais (*swabs*) ou a biópsia endometrial, uma vez que as infecções podem ser focais e não difusas em todo o endométrio (LEBLANC, 2008). Em casos de éguas que foram consideradas negativas para o crescimento bacteriano a partir de *swabs*, mas que possuem sinais de endometrite, como líquido intrauterino, presença de polimorfonucleares no exame histológico e/ou edema uterino exacerbado, LBV pode ser utilizado para aumentar as chances de isolamento de microrganismos uterinos e proporcionar o exame de susceptibilidade a antimicrobianos (LINTON; SERTICH, 2016).

Em contraste, apesar de permitir amostragem de uma área maior do endométrio, a coleta celular é diluída no conteúdo luminal, muco e/ou exsudados de uma grande superfície uterina. Entretanto, a principal desvantagem do LBV é em relação à praticidade, uma vez que, é necessária uma etapa extra, envolvendo a centrifugação e posterior suspensão celular, além da utilização de mais instrumentos em comparação às demais técnicas. (COCCHIA et al., 2012).

3.4.2 Citologia Uterina

O exame citológico do endométrio das éguas envolve a coleta e a interpretação das células que revestem o útero e seu lúmen (MCCUE, 2008). O exame é frequentemente realizado na rotina de éguas destinadas a reprodução, sendo junto com a cultura uterina, o mais utilizado para o diagnóstico da endometrite (LEBLANC, 2008). Isto ocorre devido à forma rápida de diagnosticar o processo inflamatório, uma vez que demonstra resultados pouco tempo após a coleta da amostra, além de apresentar baixo custo e ser de fácil execução (KOZDROWSKI et al., 2015; CANISSO et al., 2016).

A citologia pode detectar a presença de colônias bacterianas, hifas, fungos e cristais de urina (FERRIS et al., 2015). As amostras de citologia endometrial podem ser obtidas através de *swab* com ponta de algodão simples ou dupla, escova citológica ou lavado uterino de baixo volume (COCCHIA et al., 2012; BOHN et al., 2014; FERRIS et al., 2015).

Independente da técnica escolhida, inicia-se o procedimento com a preparação e higienização da região perineal, a qual envolve a palpação transretal para remoção das fezes e limpeza do reto, proporcionando melhor a avaliação da condição uterina. Após este procedimento, isola-se a cauda lateralmente por meio de ataduras, realizando-se a assepsia da região perineal com água e detergente neutro seguida por clorexidine 2% e secagem da região (FACTOR, 2019).

Na técnica de lavado uterino de baixo volume seguida de centrifugação, a solução uterina recuperada em tubo graduado deve ser homogeneizada e imediatamente transferida para tubos de 50mL, sendo armazenada a 4°C, seguida de centrifugação (400 rpm por dez minutos). Após a obtenção do *pellet*, o sobrenadante é descartado, permanecendo 2ml para homogeneização e extensão do mesmo sobre a superfície da lâmina e posterior coloração para esfregaço citológico (COCCHIA et al., 2012; DIELE et al., 2016).

Após a coleta da amostra, é recomendado fazer imediatamente o esfregaço (LEBLANC, 2011). As lâminas com os esfregaços devem ser deixadas secar ao ar ou, se a coloração for após 12h da coleta das amostras, utiliza-se um fixador para manter a arquitetura celular. A avaliação das lâminas deve ser sistemática e minuciosa, sendo

realizada primeiramente com baixa ampliação para determinar se há celularidade suficiente para fornecer interpretação precisa. Se a amostra for determinada como apta, a lâmina é avaliada a uma ampliação de 400 vezes e 1000 vezes em imersão de óleo, em múltiplos campos, examinando a presença de células epiteliais uterinas, glóbulos brancos, detritos, glóbulos vermelhos, bactérias, leveduras, organismos fúngicos e espermatozoides (FERRIS, 2016).

A avaliação da inflamação em esfregaços citológicos, pode ser baseada principalmente em dois métodos, na determinação do número de PMNs por campo e pela porcentagem de PMNs, presentes em relação às células endometriais (COCCHIA et al., 2012; KOZDROWSKI et al., 2015). O número de células contadas é variável de acordo com os estudos, embora Overbeck et al. (2013) tenha descrito a contagem de 300 células totais para o estabelecimento das relações células epiteliais e neutrófilos suficientes para o diagnóstico.

Na avaliação de PMNs por campo de alta potência RIDDLE et al. (2007), LEBLANC (2011) e COCCHIA et al. (2012), 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.

A avaliação da porcentagem de PMNs em relação às células epiteliais é determinada pela contagem de 200 a 400 células totais à microscopia, independentemente do número de campos. Esta técnica tem sido considerada a mais adequada, uma vez que, diferentes celularidades, de diferentes métodos de coleta de material, são avaliados com mesmo critério. Porém, a porcentagem mínima de PMNs para estipular o grau de inflamação da égua e a gravidade do processo quando está presente, ainda difere entre estudos. Isto ocorre devido à falta de consenso sobre o valor fisiológico de PMNs durante a fase de estro, uma vez que, nesta fase a migração de neutrófilos para o lúmen uterino é maior devido à predominância do estrógeno (SOARES, 2017)

As porcentagens mínimas para a determinação da inflamação variam de 0,5 a 5%, de acordo com os autores (LEBLANC, 2011). A porcentagem mínima de 0,5% foi

descrita (DIGBY; RICKETTS, 1982; NIELSEN, 2005; RIDDLE et al., 2007; CHRISTOFFERSEN et al., 2015), classificando a endometrite em negativa quando possuía menor que 0,5%, leve quando possuía de 0,5 a 5%, moderada quando possuía de 5 a 30% e grave quando possuía mais que 30% de PMNs (RICKETTS; MACKINTOSH, 1987; FALOMO et al., 2006).

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

3.4.3 Histologia Endometrial

O estudo da arquitetura do endométrio é uma ferramenta importante na avaliação da integridade uterina e revela dados impossíveis de serem diagnosticados através de exame clínico (DLUGOLECKA et al., 2019). A biópsia uterina refere-se ao fragmento de tecido coletado do endométrio para posterior avaliação histológica a fim de detectar a presença de infecção aguda ou crônica e auxiliar no diagnóstico de degeneração endometrial. O resultado da biópsia permite um prognóstico sobre o potencial reprodutivo da fêmea e avalia a capacidade do útero levar a gestação a termo de forma eficiente até a parição (KENNEY, 1975), bem como orientar o tratamento e manejo reprodutivo (KENNEY, 1978)

Na maioria dos casos, um fragmento de biópsia quando combinado com um completo exame clínico, detém de informações adequadas sobre a condição do endométrio da égua (GORDON; SARTIN, 1986). Porém 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.

A detecção de PMNs no estrato compacto do endométrio durante o exame histológico é geralmente utilizado como referência ou “padrão ouro” para

diagnosticar qualquer forma de endometrite na égua (KENNEY; DOIG, 1986; NIELSEN, 2005; LEBLANC et al., 2007; OVERBECK et al., 2011, NIELSEN et al., 2012; KOZDROWSKI et al., 2015).

Após a coleta da biópsia endometrial, o fragmento deve ser imediatamente acondicionado em solução fixadora até o seu processamento, com objetivo de manter as estruturas histológicas, sendo o formol neutro 10% e o líquido de *Bouin* os mais utilizados com esta finalidade. O período mínimo e máximo que o fragmento pode ficar na solução fixadora vai variar com o tipo de fixador utilizado (SOARES, 2017). Bactérias aderentes ao tecido endometrial foram detectadas em um número significativamente maior em amostras fixadas na solução de *Bouin* do que em formalina 10%, após procedimento de rotina. Neste estudo, a detecção de *P. aeruginosa* aderente ao tecido do endométrio equino era dependente do fixador (FERRIS et al., 2017b).

KENNEY e DOIG em 1986, propuseram um sistema de classificação dos achados histológicos em escores a partir de biópsias endometriais, que posteriormente foi adaptado por SCHOON et al. (1992), e se tornou um dos mais utilizados até os dias atuais. O Sistema consiste em classificar as éguas em quatro categorias de acordo com as alterações agudas e crônicas observadas na histopatologia do endométrio, tais como alterações glandulares, vasos sanguíneos e linfáticos, além de alterações inflamatórias e fibrose.

A categoria 1 refere-se ao tecido saudável, sem alterações. Já a categoria 2 foi subdividida em “A”, referente a inflamação e fibrose leves, e “B”, referente a inflamação e fibrose moderadas. A categoria 3, refere-se a inflamação e fibroses graves. Éguas incluídas nas categorias 2 e 3 são consideradas potencialmente susceptíveis à endometrite, enquanto éguas na categoria 1 são geralmente resistentes. Este sistema também auxilia no prognóstico dos animais, uma vez que quanto mais alterações ocorrem no endométrio, maior o grau de classificação, menores as chances das éguas se tornarem gestantes ou manterem uma gestação (KENNEY; DOIG 1986).

3.5 TRATAMENTOS

Diante da importância das endometrites nos sistemas de reprodução de equinos, as alternativas para tratamento desta patologia têm sido muito estudadas (SCOGGIN, 2016). Faz-se necessário conhecer profundamente a fisiopatologia dos agentes causadores, para compreender e identificar a causa primária das endometrites e assim estabelecer o protocolo de tratamento mais adequado (FERRIS, 2017).

Terapias convencionais preconizam o uso de antimicrobianos, anti-inflamatórios, lavagens uterinas com intuito de reestabelecer os mecanismos de defesas naturais (CANISSO et al., 2020). No entanto, com a falta de respostas às terapias tradicionais e o aumento da prevalência de resistência antimicrobiana dos patógenos, foram desenvolvidas terapias alternativas para tratar éguas com endometrite crônica (SCOGGIN, 2016). Para debelar o processo patológico, a literatura prescreve a associação das terapias convencionais com a administração de agentes mucolíticos, compostos quelantes, 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).

Lavagens uterinas são descritas na literatura e recomendadas para uso de forma estratégica no tratamento pós cobertura das éguas com excessivo acúmulo de líquido intrauterino e susceptíveis à endometrites (BRINSKO et al., 2003; BUCZKOWSKA et al., 2015; SCOGGIN, 2016). Geralmente volumes de 2 litros por lavagem são suficientes para obter uma boa distensão da parede uterina e permitir o contato da solução infundida com toda a superfície mucosa (MATTOS et al., 1997a). As soluções cristalóides como o Ringer Lactato (LRS) e solução salina 0,9% são as mais utilizadas nas lavagens uterina em éguas (VANDERWALL; WOODS, 2003). Entretanto, estudos demonstram que bactérias como *Escherichia coli*, podem utilizar o lactato presente no LRS (HUA et al., 2007) como substrato para o seu crescimento (EISENBERG; DOBROGOSZ, 1967). Estas soluções podem ser enriquecidas com potentes antissépticos e aditivos a fim de quebrar o biofilme como os agentes mucolíticos (N-acestilcisteína e dimetilsulfóxido) (CANISSO et al., 2020).

As lavagens uterinas auxiliam fisicamente na remoção dos microrganismos, detritos, células e mediadores inflamatórios e células espermáticas mortas do lúmen

uterino (BRINSKO et al., 2003; VANDERWALL; WOODS, 2003; KNUTTI et al., 2010). Podem ser realizadas a qualquer momento antes da cobertura, ou quatro horas após a cobertura. Este é considerado o tempo mínimo necessário para o esperma atingir à tuba uterina, sem interferência na fertilidade (BRINSKO et al., 1990; BRINSKO et al., 1991; FIALA et al., 2007).

As lavagens uterinas com soluções ozonizadas têm sido utilizadas para tratamento de endometrites nas éguas. Além de possuir ação antimicrobiana, o ozônio possui grande potencial na melhora do sistema imunológico, não acarreta resistência bacteriana, além de ser um tratamento de baixo custo (VILA, 2020).

O ozônio (O₃) é composto por três átomos de oxigênio (O₂), unidos por ligações simples e duplas, é considerado um alótropo triatômico do oxigênio, com potencial oxidante muito maior do que a molécula diatômica. É um gás instável, altamente volátil, incolor e com odor característico (CUNHA, 2010). Está presente na estratosfera, resultante da ação da radiação ultravioleta emitida pelo sol nas moléculas de oxigênio. Forma-se quando as moléculas de oxigênio (O₂) se rompem, sendo que, os átomos separados, combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio (KIRCHHOFF, 1995).

O ozônio foi descoberto em 1781 pelo médico holandês Martinus van Marun, porém foi publicado pelo químico alemão Christian Friedrich Schoenbein, em 1840, que estudando correntes elétricas em água notou a produção de um gás de odor forte e característico, nomeando de “ozon”, derivado do termo grego “ozein”, aquilo que cheira. Em 1857 o engenheiro e inventor Ernst Werner von Siemens construiu o primeiro gerador de ozônio em Berlim dando origem a uma série de projetos-pilotos e possibilitando experimentações terapêuticas com o gás (LUKES et al., 2006).

Um dos primeiros relatos da aplicação clínica do ozônio foram em soldados nos hospitais militares que recebiam feridos da Primeira Guerra Mundial. O ozônio era utilizado topicamente em feridas infectadas e em curativos pós-operatórios. No mesmo momento utilizaram o ozônio na forma gasosa, para tratamento de soldados afetados por gangrena gasosa devido a bactérias anaeróbicas muito sensíveis ao ozônio (STROKER et al., 1916; STROKER et al., 1917).

Nos últimos anos a ozonioterapia tem sido cada vez mais desenvolvida e difundida em razão dos seus efeitos benéficos, que são alcançados através de uma reação

química inicial, que se origina a partir do contato de cada molécula de O₃ com as ligações duplas de cadeia lipídicas que constituem as paredes das membranas celulares, produzidos através de suas diversas formas de aplicação. Através dessa reação geram uma série de segundo mensageiros, os peróxidos de hidrogênio, hidroperóxidos, ozonídeos e lipídios oxidados, que são os responsáveis por modular e estimular tanto as respostas antioxidantes sistêmicas, quanto a resposta imunológica do hospedeiro (RODRÍGUEZ et al., 2018; Almeida et al., 2021). Penetrar a camada lipídica das membranas celulares está entre as principais ações do peróxido de hidrogênio e outros ozonídeos (VARGAS et al., 2019).

O ozônio pode ser produzido artificialmente com o uso de um gerador formando o gás com a passagem do oxigênio puro através de uma descarga elétrica de alta voltagem e frequência (SIMEK; CLUPEK, 2002). A técnica consiste na utilização de uma mistura dos gases oxigênio e ozônio, por diversas vias de administração. Nos equinos o ozônio pode ser utilizado pela via sistêmica, via retal, muscular e auto-hemoterapia, ou através da aplicação local pelas vias subcutânea, intrasínovial, intrarticular, intravesical, intraóssea, intraperitoneal, intracavitária, intrauterina, subfacial, peritendinosa, epidural, intramuscular e transcutânea (VIGLINO, 2008).

De acordo com a indicação e tipo de aplicação, a concentração pode variar entre 3 e 60 mg/L correspondendo a uma mistura de oxigênio-ozônio em relações entre 0,05% de ozônio a 99,95% de oxigênio e 5% de ozônio a 95% de oxigênio. O médico veterinário habilitado deverá determinar a dose adequada e a via de aplicação de acordo com a indicação e as condições do paciente (OLIVEIRA, 2007). Segundo a Associação Brasileira de Ozonioterapia (ABOZ), pelo fato da molécula de O₃ ser quimicamente instável, sua forma medicinal sempre é preparada imediatamente antes do uso, para administração imediata. A molécula de O₃ possui meia vida de 40 minutos a 20°C - 25°C, e se decompõe a partir desse momento, em oxigênio. A velocidade de decomposição vai depender da temperatura ambiente (BECK et al., 1998; BULIES, 2005; RIFA, 2005; BOCCI, 2006). De acordo com Beck et al. (1998), 55 mL de O₃ no seu estado gasoso, dentro de uma seringa, tem uma meia vida de 50 minutos.

A ozonioterapia tem sido utilizada para tratar endometrites persistentes. Segundo Zobel (2013), o tratamento intrauterino com O₃ proporciona um ambiente mais favorável para inseminação e fertilização, através da redução dos efeitos

espermicidas e da inflamação decorrente da endometrite. O mecanismo de ação ocorre por meio da redução do quadro inflamatório, da melhora da perfusão dos tecidos lesados e da ativação do sistema imune, com base na produção de citocinas.

O potencial desinfetante do ozônio atribui-se à sua capacidade de romper a membrana celular dos microorganismos, causando extravasamento de íons e moléculas intracelulares, desencadeando a morte celular (ZHANG et al., 2016; DURRANI, 2017), bem como causar ruptura do biofilme uterino (VARGAS et al., 2019).

Em éguas, lavagens uterinas utilizando água ozonizada produziu 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.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PERÍODO E LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

No que diz respeito às questões de bioética e bem-estar animal, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UENF protocolo nº 528). Os animais avaliados na pesquisa pertencem a propriedades localizadas no Município de Campos dos Goytacazes e Cardoso Moreira, Rio de Janeiro. Os exames laboratoriais foram realizados no Setor de Microbiologia do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. O estudo foi conduzido durante o período de janeiro de 2022 a dezembro de 2022.

4.2 AMOSTRAGEM

Foram utilizadas 18 éguas das raças Mangalarga Marchador, Quarto de Milha e mestiças, sendo 1 doadora e 17 receptoras de embriões, com idade média de $7,5 \pm$

2,5 anos e peso médio de 400 ± 50 Kg. Os animais são criados em sistema de pastejo extensivo e água potável *ad libitum*, no entanto a doadora recebe dieta à base de feno de tifton (*Cynodons sp.*) e sal mineral para equinos.

Foram incluídas no experimento égua doadora que apresentava quadro de subfertilidade e dificuldade pra emprenhar, com presença de líquido uterino e receptoras de embriões que obtiveram 2 ou mais diagnósticos negativos de gestação após transferência de embrião no transcorrer da estação de monta atual ou passada, apresentando cultura microbiológicas positivas para bactérias HISTOLOGICO, BIOPSIA. As receptoras eram refugos das propriedades, apresentavam escore corporal 3 (magro), de acordo com Henneke et al. (1983).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As éguas selecionadas foram acompanhadas durante dois ciclos estrais consecutivos.

No 1º ciclo, as colheitas foram realizada nos primeiros dias do estro, quando foram identificados edema de no mínimo 2 (de uma escala de 0 a 5), segundo Ginther (2007); ou quando a égua estivesse apresentando folículo ovariano acima de 35 mm. No 1º dia do cio, foram realizadas coleta de material biológico para cultura microbiológica (lavado de baixo volume), citológica (lavado de baixo volume) e biópsia uterina. Obrigatoriamente as coletas seguiram essa ordem, de acordo com o nível de agressão tecidual, para não haver contaminações cruzadas entre as coletas. Éguas que estavam no diestro, foram submetidas a protocolos hormonais, a fim de antecipar o ciclo estral. Anotar só prostaglandina.

O 2º ciclo corresponde ao 2º ciclo estral das éguas, onde foram realizados os tratamentos, que acompanharam os primeiros dias do estro, quando foram identificados edema de no mínimo 2 (de uma escala de 0 a 5, segundo) Ginther (2007); ou quando a égua estivesse apresentando folículo ovariano acima de 35 mm, assim, o 1º dia do cio, correspondeu ao 1º dia de tratamento e assim sucessivamente.

As éguas foram agrupadas de acordo com o resultado da cultura microbiológica. As 18 éguas apresentaram cultura positiva para bactérias, sendo assim, o grupo controle (GRL) composto por nove éguas foi submetido à lavagem

uterina com solução de ringer lactato pura, por dois dias consecutivos. O GO (grupo ozônio), composto por nove éguas, foi submetido a duas lavagens uterinas com solução ringer com lactato ozonizada, por três dias consecutivos.

Para ozonizar a solução de ringer com lactato foi utilizado um equipamento gerador de ozônio portátil modelo ZVet (Ozonebras®), na concentração 50 µg de O₃/mL de oxigênio obtida através da regulagem do fluxômetro de entrada de O₂ em ¼ litros por minuto permitindo uma boa taxa de borbulhamento e conseqüentemente uma eficiente ozonização do Ringer com lactato. O gás foi injetado continuamente durante 10 minutos na parte inferior do frasco de ringer com lactato. Devido à instabilidade do ozônio em soluções aquosas, as lavagens uterinas foram realizadas imediatamente após o preparo da solução.

Nova coleta para cultura microbiológica (LBV), citologia e biópsia uterina foram realizadas 24 horas após o último dia tratamento.

4.4 COLETA DE LAVADO UTERINO

Foi realizada a palpação retal com acompanhamento ultrassonográfico para a identificação do início do estro das éguas. Os animais que foram identificados no cio foram separados e posteriormente contidos adequadamente em tronco de contenção.

A cauda foi envolvida pelo protetor de cauda e contida lateralmente, em seguida, realizada a limpeza do reto, para evitar possíveis contaminações com as fezes. A higienização da vulva foi realizada primariamente com sabão neutro e posteriormente com clorexidina degermante 2%, sendo esse processo de lavagem repetido quantas vezes fosse necessário até que a região perineal estivesse limpa e a secagem foi realizada com toalhas de papel descartáveis.

Para a obtenção do lavado de baixo volume (LBV) foi realizada a lavagem uterina, por meio de sonda de Foley®, nº 22 (Solidor®, China) e condutos siliconizados. Foi infundido no útero aproximadamente 200mL de solução fisiológica, seguida de massagem uterina, por via transretal para auxiliar a recuperação do volume de solução infundida. A solução recuperada no próprio frasco de soro foi homogeneizada e no laboratório foi transferida para tubos de 50mL tipo Falcon®. O efluente é centrifugado (400 rpm por 10 minutos) e o *pellet* sedimentado foi submetido

aos meios de culturas específicos pra crescimento fúngico, Ágar Saboraand, e bacteriano, Ágar Sangue e Ágar Macconkey. As amostras foram incubadas em estufas com temperatura controlada de 35 a 37°C por 48 horas para posterior avaliação.

A citologia endometrial foi obtida do mesmo lavado uterino de baixo volume seguido de centrifugação utilizado para a cultura microbiológica. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, remanescendo 2mL do “*pellet*” para homogeneização e confecção do esfregaço. Que foi realizado com a escova citológica deslizando levemente em movimento rotatórios pela lâmina de microscopia, seca ao ar e corada com Kit Panótico Rápido (Laborclin® - Paraná, Brasil). Após a coloração as lâminas foram avaliadas por microscopia de lux (Eclipse E200, Nikon®, Tokio, Japão) em aumento de 1000 x sob imersão em óleo, por um mesmo avaliador, de forma a contabilizar a proporção de PMNs em relação a células endometriais, sendo contabilizadas 200 células, independentemente do número de campos avaliados por lâmina. O resultado foi expresso em porcentagem de PMNs em relação às células endometriais.

4.5 BIOPSIA UTERINA

A biópsia endometrial foi realizada com a pinça de Yeoman (Botupharma®) estéril revestida por camisa sanitária plástica (IMV®, França). Ao adentrar o óstio caudal da cérvix a camisa sanitária foi rompida e a pinça inserida até a extremidade cranial do corpo, na região de bifurcação dos cornos uterinos. A mão do técnico que está realizando o exame é retirada da vagina e por via retal faz pressão do útero contra a pinça. Fecha a pinça para apreender o fragmento e traciona caudalmente para retirada do útero. As amostras foram fixadas em solução de *Bouin*, onde permaneceram por 24 horas e depois foram acondicionadas em álcool 70%, e encaminhadas para o Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Estadual do Norte Fluminense onde foram preparados os cortes e corados com hematoxilina e eosina.

Foi realizada a pesquisa e 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 a comparação dos dados anteriores e posteriores aos tratamentos do grupo controle e grupo teste.

4.6 LAVAGENS UTERINAS

Dezoito éguas foram submetidas à lavagem uterina, destas, nove com riger com lactato e nove com solução ringer com lactato ozonizada. O GRL foi submetido a duas lavagens uterinas com ringer com lactato, por dia, utilizando 1 litro por lavagem. Os animais do GO foram submetidos ao mesmo procedimento supracitado, no entanto, utilizando solução ringer com lactato ozonizada. Na primeira lavagem foi infundido 1L da solução ozonizada, massageando o útero e após 3-5 minutos, o conteúdo foi drenado por gravidade e o volume mensurado, para verificar se houve retorno total do líquido. Na segunda lavagem, repetiu o procedimento, no entanto, quando o conteúdo foi drenado, mensurou e deixou cerca de 150 mL do líquido dentro do útero. O GRL foi submetido às lavagens por dois dias consecutivos e o GO, por três dias. Após 3-4 horas do término das lavagens, do último dia de tratamento de ambos os grupos, foram administrados 15 UI de ocitocina e após 1 hora, 5 mg de prostaglandina $f2\alpha$, a fim de promover contração uterina e eliminação total do líquido intrauterino.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a execução dos arquivos no Microsoft Excel, foi realizada a consistência dos dados verificando as variáveis e utilizando a categorização estabelecida para situação do animal, pode-se aplicar o teste qui-quadrado (χ^2), que visa verificar a diferença significativa entre os dois tratamentos com relação ao status de melhora ou não do animal. O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$. Os dados referentes a análise citológica foram modelados ajustando uma regressão logística, com função Logit e ajustes para sobredispersões. Empregou-se a técnica de estatística descritiva por meio da distribuição das frequências relativa e absoluta para os achados histológicos.

6 RESULTADOS E DUSCUSSÃO

Dos 18 animas com histórico de infertilidade selecionados para o experimento, 18 (100%) apresentaram resultado positivo no exame de citologia endometrial. A citologia, apresentou-se dentro do esperado, no entanto, este estudo diferiu do descrito por Takakura, 2020, que avaliando 33 animais, 22 (66,6%) apresentaram resultado positivo e 11 (33,3%) apresentaram resultado negativo para citologia endometrial. Assim como Rua e colaboradores (2018) que, avaliando 51 animais com histórico de infertilidade, obtiveram 25,5% de resultados negativos no exame de citologia endometrial.

Após o tratamento, observou-se que 9 (100%) animais do GRL permaneceram com o exame citológico positivo. No GO 6 (66,6%) animais obtiveram citologia negativa e 3 (33,3%) positivas (Tabela 1).

Tabela 1- Resultado do exame citológico antes e após tratamento.

	Positivo	Negativo	Tratamento	Positivo	Negativo
GRL	9 (100%)	0	T0	9 (100%)	0
GO	9 (100 %)	0	T1	3 (33,3 %)	6 (66,6%)

GRL: grupo controle e GO: grupo que receberá solução de ringer com lactato ozonizada. TO: corresponde ao grupo que recebeu a solução ringer com lactato (GRL) e T1 ao grupo que recebeu solução de ringer com lactato ozonizada (GO). $X^2= 6,25$ e $p = 0,01242$.

O resultado citológico do GO, corrobora com os achados de Takakura, 2020, que após o tratamento utilizando solução fisiológica ozonizada, 11 (47,83%) animais apresentaram melhora na avaliação citológica. Àvila, 2020 não detectou diminuição da média de neutrófilos, mantendo-se igual antes e após o tratamento com infusão de gás ozônio intrauterino em éguas.

Dos animais considerados positivos para a citologia endometrial, 11 (61,1%) apresentaram grau leve de inflamação e 7 (38,8%) grau moderado previamente ao tratamento. Após a aplicação do tratamento controle (GRL) os 9 animais não apresentaram alteração no grau de inflamação. Após a aplicação da solução ringer com lactato ozonizada (GO), 3 (33,3%) animais não apresentaram alteração no grau de inflamação e 6 (66,6%) apresentaram melhora, com a diminuição da resposta

inflamatória, determinada pela queda do número de neutrófilos, mostrando este ser eficaz para o controle da inflamação (Tabela 2).

Tabela 2- Frequências observadas no exame citológico para classificação das endometrites de acordo com a porcentagem de PMN's antes e após tratamento.

	GRL	GO	TO	T1
Leve	6 (66,6%)	5 (55,5%)	6 (66,6%)	3 (33,3%)
Moderado	3 (33,3%)	4 (44,4%)	3 (33,3 %)	-----
Total	9	9	9	3

GRL: grupo controle e GO: grupo que receberá solução de ringer com lactato ozonizada. TO: corresponde ao grupo controle que recebeu a solução ringer com lactato (GRL) e T1 ao grupo que recebeu solução de ringer com lactato ozonizada (GO).

No grupo controle (GRL) não houve diferença significativa ($P>0,01$) na porcentagem de polimorfonucleares antes e após o tratamento. O que difere de Canisso et al. (2020) na qual, a lavagem uterina pode reintroduzir neutrófilos viáveis para restabelecer a degradação dos microrganismos, nos casos onde haja uma estagnação do estado inflamatório. No entanto Takakura, 2020, relata que o grupo que recebeu tratamento controle, solução fisiológica, 50% dos animais apresentaram melhora no quadro citológico.

Sobre os resultados encontrados na cultura uterina, os 18 (100%) animais apresentaram cultura microbiológica positiva (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados obtidos através da cultura microbiológica, especificando os agentes etiológicos e a caracterização do “gram”, antes e após o tratamento.

Grupos	Pré-Tratamento			Pós-Tratamento		
	Bactéria	Gram	Cultura	Bactéria	Gram	Cultura
GRL	E. Coli (3/9)	-	+	E. Coli (3/9)	-	+
	Pseudomonas aeruginosa (2/9)	-	+	Pseudomonas aeruginosa (2/9)	-	+
	Streptococcus spp (1/9)	+	+	Streptococcus spp (1/9)	+	+
	Staphylococcus spp (3/9)	+	+	Staphylococcus spp (3/9)	+	+
GO	Corynebacterium (1/9)	+	+	Corynebacterium (1/9)	+	+
	E. Coli (4/9)	-	+	E. Coli (4/9)	-	-
	Pseudomonas aeruginosa (3/9)	-	+	Pseudomonas aeruginosa (3/9)	-	-
	Streptococcus spp (1/9)	+	+	Streptococcus spp (1/9)	+	+

GRL: grupo controle e GO: grupo que receberá solução de ringer com lactato ozonizada.

Dentre os agentes etiológicos encontrados na cultura pré-tratamento, observou-se que 39% dos exames foram positivos para *Escherichia coli*; 28% para *Pseudomonas*, 17% para *Staphylococcus sp.*, 11% para *Streptococcus sp.* e 5% para *Corynebacterium*. (Figura 1).

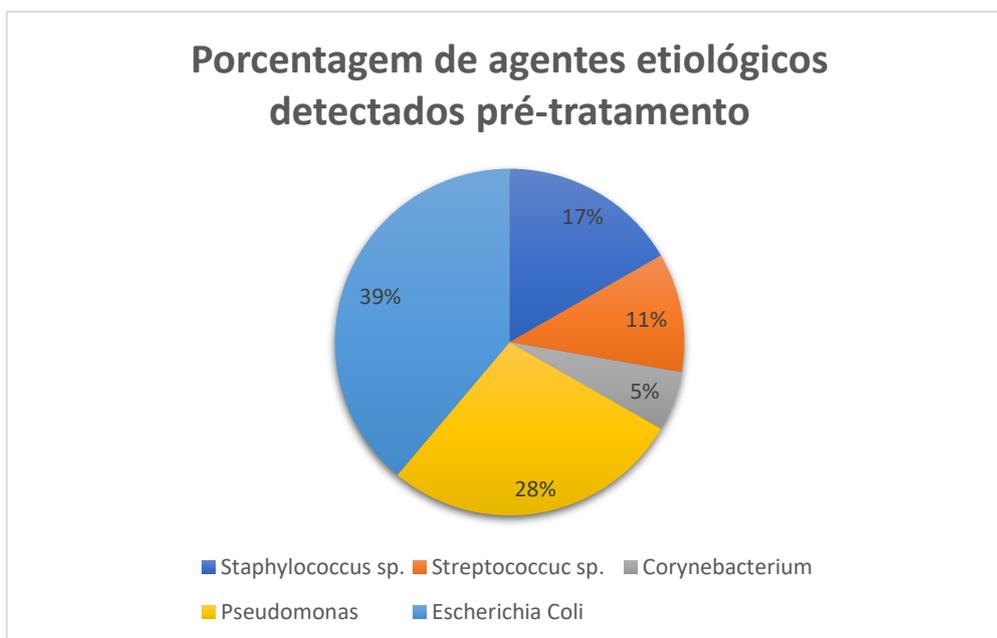


Figura 1: Figura 1: Porcentagem dos agentes etiológicos encontradas no exame de cultura microbiológica no pré-tratamento: 17 % *Staphylococcus sp.*, 11% *Streptococcus sp.*, 5% *Corynebacterium*, 39% *Escherichia coli*, e 28% *Pseudomonas*.

Os agentes etiológicos encontrados no presente estudo condizem com os achados por Ávila, 2020 que detectou a presença de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp.* e os descritos por LeBlanc et al., (2007) que obteve a predominância da *E. coli* (42,2%) seguido do *Streptococcus* (37,6%). Canisso et al., (2016) relatam que as bactérias mais comumente isoladas são *Streptococcus*, Coliformes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Já com os dados obtidos no exame de cultura pós-tratamento, no GRL 100% (9/9) dos animais mantiveram a infecção uterina, causados pelos mesmos agentes etiológicos; no GO 77,7% (7/9) dos animais não foram observados crescimento bacteriano e 22,2% (2/9) dos animais mantiveram-se com exame de cultura positivo. Observa-se que o tratamento foi eficaz para as bactérias gram negativas, e não obteve efeito se quer em gram positivas, o que difere do descrito por Campos et al. (2018), que obtiveram sucesso no tratamento com infusão do gás ozônio de endometrites causadas por *Staphylococcus aureus*. Achados no presente estudo corroboram com

Montechiesi e Ignácio (2018), que obtiveram cultura negativa para *Pseudomonas sp.*, após tratamento com solução de ringer com lactato ozonizada associado a insuflação uterina com gás ozônio. Os resultados apresentados pelo GRL, após o tratamento, condizem com os obtidos por Ávila, 2020, em que 57% dos animais mantiveram-se com infecção uterina. Os animais que mantiveram culturas positivas após ambos os tratamentos, podem não terem sido responsivos pela presença de biofilme, como afirma Zargarán et al. (2017), em que tratamento não foi capaz de realizar a remoção completa dos biofilmes de *Candida albicans* mesmo após 60 minutos de exposição.

De acordo com a regressão logística, aplicada pela análise estatística, éguas com cultura positiva para bactérias gram negativas, tratadas com solução de ringer com lactato ozonizada, possuem 5,12 vezes mais chances de cura em relação as bactérias gram positivas. Confirmando assim a ação do ozônio contra endometrites infecciosas causadas por bactérias gram positivas, como foi mostrado por Rodriguez et al. (2018), que a ação oxidante do O₃ leva à destruição das paredes bacterianas e das membranas citoplasmáticas de fungos, além de agir contra os protozoários e vírus; e por Thanomsub et al. (2002) que demonstraram as mudanças estruturais causadas em bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*), por exposição ao ozônio, sendo esta bactéria também encontrada no útero das éguas deste estudo como causadoras da endometrite bacteriana antes do tratamento.

O presente estudo detectou que os 18 (100%) animais positivos para o exame citológico, também obtiveram resultados positivo para cultura bacteriana (Tabela 4), corroborando com Campos et al. (2018), que detectaram citologia e cultura positiva em 8 éguas previamente ao tratamento de infusão de gás ozônio intrauterino. No entanto, difere do trabalho realizado por Overbeck et al. (2011), que obtiveram 6 amostras de citologia negativa em éguas com endometrites causada por *E. coli*. Ricketts e Mackintosh (1987), documentaram que em apenas 12% das culturas positivas, haviam evidências citológicas de inflamação, demonstrando que a citologia é falha quando utilizada como único método para diagnosticar inflamação endometrial. Langoni et al. (1994), relatam que a chance de se obter exame citológico positivo associado ao exame microbiológico também positivo foi de 4,13 vezes mais do que a chance de se ter um resultado de citologia negativo e bacteriológico positivo, ou seja, o resultado é de grande valia correlacionado com a bacteriologia.

Tabela 4: Resultados referentes ao exame de citologia e cultura bacteriana dos grupos GRL e GO antes do tratamento.

Grupos	Citologia	Bactéria	Gram	Cultura
GRL	Positiva (100%)	E. Coli (33,3%)	-	+
		Pseudomonas aeruginosa (22,2%)	-	+
		Streptococcus spp (11,1%)	+	+
		Staphylococcus spp (33,3%)	+	+
GO	Positiva (100%)	Corynebacterium (11,1%)	+	+
		E. Coli (44,4%)	-	+
		Pseudomonas aeruginosa (33,3,%)	-	+
		Streptococcus spp (11,1%)	+	+

GRL: grupo controle e GO: grupo que receberá solução de ringer com lactato ozonizada.

Os achados histológicos foram classificados em escores a partir de biópsias endometriais, de acordo com Kenney e Doig (1986), adaptado por Schoon et al. (1992).

Tabela 5: Frequências observadas nos achados histológicos, classificados segundo Schoon et al. (1992).

Grupos	Pré-Tratamento	Pós-Tratamento
	Biópsia	Biópsia
GRL	IIb (55,5%)	IIb (55,5%)
	III (44,4%)	III (44,4%)
GO	IIb (33,3%)	IIb (33,3%)
	III (55,5%)	III (55,5%)
	I (11,1%)	I (11,1%)

GRL: grupo controle e GO: grupo que receberá solução de ringer com lactato ozonizada.

De acordo com a tabela 5, nota-se que não houve diferença nas avaliações histológicas antes e após os tratamentos. No GRL, previamente ao tratamento, 55,5% (5/9) dos animais apresentaram grau de inflamação e fibrose moderada e 44,4 % (4/9) apresentaram grau de inflamação e fibrose grave; no GO, 33,3% (3/9) apresentaram grau de inflamação e fibrose moderado, 55,5% (5/9), apresentaram grau de inflamação grave e 11,1% (1/9) apresentou tecido saudável, sem alterações. Este animal classificado sem alteração na histopatologia, refere-se a égua doadora de embrião que obteve citologia positiva moderada e cultura bacteriológica positiva para E. Coli e foi responsiva ao tratamento, uma vez que, teve redução na contagem de PMN's e apresentou cultura bacteriológica negativa após o tratamento, neste presente momento este animal encontra-se prenhe.

No exame histológico, apenas 1 (5,5%) animal do grupo GO apresentou discreto infiltrado inflamatório no estrato compacto do endométrio previamente aos tratamentos. Devido ao grau de comprometimento e cronicidade das amostras, não foi possível identificar infiltrados inflamatórios e contagem de PMNs nas demais amostras. Diferindo dos achados por Takakura, (2020), que relatou que 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). Considerando o resultado histológico negativo após o tratamento, ou seja, obtendo a cura, Takakura, (2020) relatou que 14 (61%) dos animais tratados com solução fisiológica ozonizada foram curados e que apenas 3 (30%) dos animais tratados com solução fisiológica apresentaram cura, divergindo do presente estudo, que não demonstrou melhora em ambos os grupos tratados, GRL e GO. As amostras histológicas do presente estudo, tanto do GRL e GO previamente ao tratamento, apresentavam alterações glandulares, com glândulas endometriais ativas e altamente secretivas, presença de distúrbios circulatórios, evidenciados pela presença de lacunas linfáticas e edema no estrato compacto. As amostras também apresentavam processo congestivo hemorrágico exacerbado, tanto no estrato compacto, quanto no estrato esponjoso do endométrio e presença de tecido conjuntivo fibroso. Estas alterações permaneceram nas amostras avaliadas após os tratamentos em ambos os

grupos. Acredita-se que este processo crônico esteja relacionado a serem éguas receptoras, refugo de centrais de reprodução, ou seja, éguas que já haviam sido retiradas do processo de transferência de embriões por histórico de infertilidade e problemas uterinos detectados por Médicos Veterinários anteriores.

Neste quesito, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos quando levada em consideração o resultado da presença de PMNs obtido através de histologia endometrial.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o tratamento com a solução ozonizada reduz a contagem de PMNs, modulando o processo inflamatório, efeito ausente no grupo controle. A utilização do ozônio mostra-se uma técnica eficaz e seguro para para o tratamento da endometrite infecciosa causadas por bactérias gram negativas, principalmente as causadas por *Pseudomonas* e *E. Coli*. Deste modo, a ozonioterapia pode ser utilizada em animais que apresentam endometrites infecciosas e na rotina de doadoras de embrião susceptíveis a endometrite persistente pós cobertura.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, observa-se que o resultado da ozonioterapia sofre interferências de acordo com o animal e o agente etiológico causador da endometrite. Por isso, o tempo de tratamento, a concentração de O₃, a associação ou não das técnicas e vias de administração devem ser mais estudadas a fim de intensificar e potencializar seu efeito em diferentes tipos de infecções, com diversos agentes etiológicos e históricos reprodutivos individuais de cada animal.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONIOTERAPIA. **Informações que a sociedade europeia de ozonioterapia recomenda sejam dadas aos pacientes** (Traduzida, revisada e acrescida com mais informações pela ABOZ – Associação Brasileira de Ozonioterapia). Disponível em: <www.aboz.com.br>. Acesso em: 25 dez. 2021.

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.

ALBIHN, A., BÅVERUD, V., MAGNUSSON, U. Uterine Microbiology and Antimicrobial Susceptibility in Isolated Bacteria from Mares with Fertility Problems. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 44, n. 4, p. 121-129, 2003. Disponível em: <https://actavetscand.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1751-0147-44-121>.

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, n. 5, p. 230-237, 2005. Disponível em: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/10.1111/j.1365-2795.2005.01477.x>. Acesso em: 30 out. 2019.

ALVARENGA, M. A. Diagnóstico e tratamento de endometrite fúngica em éguas. In: IX CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 2008. São Paulo, Brasil. **Anais...** São Paulo. 2008.

AMARAL, M.G., PIMENTEL, C.A., MEIRELES, M., FIALA, S. M., SCHRAMM, R., XAVIER, E.G., MENDONÇA M. Endometrite eqüina. Fungos e bactérias. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 216, p. 875-884, 2007.

ANWAR, H., STRAP, J. L., COSTERTON, W. Establishment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 7, p. 1347-1351, 1992.

ASBURY, A.C., SCHULTZ, K.T., KLESIUS, P.H., FOSTER, G.W., WASHBURN, S.M. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. **Journal of Reproduction and Fertility**, 32, 151-159, 1982.

ÁVILA, A. C. A. **Ozonioterapia no tratamento de endometrite em éguas**. 2020. xi, 49 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)—Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

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 mares endometrium. **Theriogenology**, v. 29, n. 6, p. 1269-1283, 1988.

BECK, E. G., WASSER G., VIEBAHN-HÄNSLER, R. The Current Status of Ozone Therapy: Empirical Developments and Basic Research. **Forsch Komplementärmed**, v. 5, n.1, p.61-75, 1998.

BOCCI, V. A. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. **Archives of Medical Research**, v. 37, p. 425-435, 2006.

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, n. 4, p. 594-600, 1 dez. 2014.

BRENNEIS, H., HANSCH, G. Granulozytenfunktionsstörungen: Formen und Diagnostik. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v.18, p. 1117-1129, 1993.

BRINSKO, S. P., VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L., MEYERS, S. A. The effect of postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, v. 33, n. 2, p. 465-75, fev. 1990.

BRINSKO, S. P., VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1111-1119, 1991.

BRINSKO, S. P., RIGBY, S. L., VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. In: Proceedings of the 49th Annual Conference of the American Association of Equine Practitioners., 1, **Anais...**2003. Disponível em: <<http://www.aaep.org>>.

BRINSKO S, BLANCHARD T, SCHUMACHER J, VARNER D, LOVE C. **Manual of equine reproduction**. 3^oed. Philadelphia, PA, USA: Mosby/Elsevier, 2011.

BRITO, L. F. C., BARTH, A. D. Endometritis in mares. **Large Animal Veterinary Rounds**. v. 3, i. 9, p. 279-283, 2003.

BROWN, M. R. W., ALLISON, D. G., GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 6, p. 777–780, dez. 1988.

BUCCA, S., CARLI, A., BUCKLEY, T., DOLCI, D., FOGARTY, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, n. 7, p. 1093-1100, 2008.

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

BULIES, E.J.C. Oxígeno-ozonoterapia como coadyuvante en el tratamiento de las infecciones óseas. **Revista Cubana Ortopedia Traumatología**, Havana, v. 19, n. 1, 2005. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864215X2005000100002>. Acesso em: 28 nov. 2009.

CAMOZZATO, G. C. **Endometrite na égua**. 2010. 35f. Monografia (Graduação) – Faculdade de Veterinária, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CAMPOS, D. G., Sá, N. M. B., Testa, A. C., Pinna, A. E. Uso do ozônio no tratamento da endometritis em éguas: relato de casos. **Revista + Equina**, p.24-26, ano 13 - nº 78 - julho / agosto 2018.

CANISSO, I. F., STEWART, J., SILVA, M. A. C. Endometritis - Managing Persistent PostBreeding Endometritis. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 32, n. 3, 465-480, 2016.

CANISSO, I. F., SEGABINAZZI, L. G. T. M., FEDORKA, C. E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares-a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. **International journal of molecular sciences**, v. 21, p. 1432, 2020.

CARMONA, J. M. P. **Resposta inflamatória uterina em éguas submetidas a inseminação artificial**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

CASLICK, E. A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. **Cornell University College of Veterinary Medicine**, v.27, p.178-187, 1937.

CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M. Introduction to de fungi and fungous infeccion. In: CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M., ROBERTS, G.H.C., RIKIHISA, Y. (Eds), **Essentials of Veterinary Microbiology**. Philadelphia: Williams and Wilkins, p. 251-256, 1995.

CAUSEY, R. C. Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. **The Veterinary Journal**, v.172, n.3, p.405-421, 2006.

CAUSEY, R. C., MILETELLO, T., O'DONNELL, L., LYLE, S. K., PACCAMONTI, D. L., ANDERSON, K. J., LEBLANC, M. M. Pathologic effects of clinical uterine inflammation on the equine endometrial mucosa. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v. 54, p. 276–277, 2008.

CHRISTOFFERSEN, M., MAJA SÖDERLIND, M., RUDEFALK, S. R., PEDERSEN, H. G., ALLEN, J., KREKELER, N. Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by *Streptococcus zooepidemicus*. **Theriogenology**, v. 84, n. 8, p. 1283-1290, 2015. Dispon283-1290, 2015.AJA SÖDERLIND, M., RUDEFALK, S. R., PEDERAAcesso em: 26 nov. 2021.

CHRYSANTHOPOULOU, A., MITROULIS, I., APOSTOLIDOU, E., ARELAKI, S., MIKROULIS, D., KONSTANTINIDIS, T., KAMBAS, K. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. **The Journal of Pathology**, v. 233, n. 3, p. 294-307, 2014.

COCCHIA N., PACIELLO O., AULETTA L., et al. 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, n. 1, p. 89-98, 1 jan. 2012.

CUNHA, M.G.R. **Ozonioterapia: Tratamento coadjuvante da dor na fibromialgia**. 2010. 75 f. Monografia (Especialização) - Curso de Prática Ortomolecular, Universidade Veiga de Almeida, Salvador, 2010.

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

DASCANIO, J. J. Treatment of fungal endometritis. **Current Therapy in Equine Reproduction**. Editado por SAMPER, J. C. [et al.] Cap. 16, p. 116-120. 2007.

DASCANIO, J.J. How and when to treat endometritis with systemic or local antibiotics. **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners** , v. 57, p. 24-31, 2011.

DASCANIO, J. J, MCCUE, P. M. **Equine reproductive procedures**. Wiley Blackwell, p. 578, 2014.

DASCANIO, J. J., SCHWEIZER, C., LEY, W. B. Equine fungal endometritis. **Equine Veterinary Education**, v. 13, n. 6, p. 324–329, 5 jan. 2010.

De Almeida, B.F.M.; Amatti, L.Z.; de Souza, G.G.; Garcia, L.V.; Montechiesi, D.F.; Ignácio, F.S.; de Oliveira, P.L.; Costa, L.R.; Floriano, B.P.; Bosculo, M.R.M. Effect of uterine ozone therapy and anticoagulant sampling on oxidative stress parameters in mares. **Research in Veterinary Science**. 2021, 136, 503–511.

DIEL, M., AMORIM, D., GARTLEY, C. J., FOSTER, R. A, HILL, A, SCHOLTZ, E. L., 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.

DIGBY, N. J. W., RICKETTS, S. W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 181-185, 1982.

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

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

DURICIC, D., VALPOTIC, H., ZURA ZAIA, I., SAMARDZIJA, M. Comparison of intrauterine antibiotics versus ozone medical use in sheep with retained placenta and following obstetric assistance. **Reproduction in domestic animals**, v. 51, p. 538-540, 2016.

DURRANI, A. Z., RAZA, M. U., CHANNA, A. A. An alternative therapy with ozone to avoid antimicrobial resistance (AMR) in uterine infections in dairy cattle. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**. v. 1, n. 3, p. 1-7, 2017.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, n. 44, p. 697, 1991.

DYCE, K. M. **Tratado de anatomia veterinária**. Tradução de: Textbook of veterinary anatomy, 4th ed - Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 398-410 p.

EISENBERG, R. C., DOBROGOSZ, W. J. Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 93, n. 3, p. 941-949, 1967.

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, A.C. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **Journal Reproduction Fertility Supplement**, v. 35, p. 327-342, 1987.

FACTOR, L., CRUZ, D. S. G., ORLANDI, C. M. B. Métodos de coleta de amostra para exame de citologia endometrial em éguas com endometrite. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 43, n. 3, p. 748-755, jul./set. 2019.

FALOMO M. E., CORRÒ M., CAVICCHIOLI L., CASTAGNARO M., MARZINI B., VENTURA S., ROTA A. Interpretazione degli esami batteriologico, citologico e biotico uterino nella fattrice. **Ippologia**, v. 4, p. 27-32, 2006.

FERRIS, R.A., DERN, K.; VEIR, J.K.; HEWLEY, J.R.; LAPPIN, M.R.; McCUE, P.N. Development of a broad-range quantitative polymerase chain reaction assay to

detect and identify fungal DNA in equine endometrial samples. **American Journal Veterinary Research**, v. 74, p. 161-165, 2013.

FERRIS, R. A. et al. Evaluation of biofilms in gram-negative bacteria isolated from the equine uterus. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 121, jan. 2014.

FERRIS, R. A.; BOHN, A.; MCCUE, P. M. Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. **Equine Veterinary Education**, v. 27, n. 6, p. 316-322, jun. 2015.

FERRIS, R. A. Endometritis - Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. **Veterinary Clinics: Equine Practice** v. 32, p. 481-498, 2016.

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. et al. Model of chronic equine endometritis involving a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 12, 2017b.

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

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, n. 7, p. 556-562, 2007.

FRANDSON, RD; WILKE, WL & FAILS, Ad. **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 339, 2014.

FRONTOSO, R. et al. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 1, p. 1-6, 2008.

FUMUSO, E.A., AGUILAR, J., GIGUÈRE, S., RIVULGO, M., WADE, J., ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, n. 1-2, p. 30-39, 2007.

GALHÓS, A. C. V. **Abordagem prática aos métodos de diagnóstico de endometrite equina**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade técnica de Lisboa. Lisboa, 2018.

GHASEMZADEH-NAVA, H., GHASEMI, F., TAJIK, P. A review of mare endometritis in Iran. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, p. 188-191, 2004.

GOMES, G.M., CRESPILO, A.M., LEÃO, K.M., JACOB, J.C.F., GOMES, L.P.M., SEGABINAZZIE, 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.

GORDON, L. R., SARTIN, E. M. Endometrial biopsy as na aid to diagnosis and prognosis in equine infertility. **Journal of Equine Medicine Surgery**, v. 2, p. 328-336, 1986.

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.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri-SP: Manole, p. 13, 21-24, 59, 193-210, 2004.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L.; YEATS, B. F. Relationship between body condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 4, p. 371-372, Nov. 1983.

HEREDIA, M. Lavaje uterino com Agua ozonizada para el tratamiento de endometrites em yeguas. In: IV World Congresso Oxygen-Ozone Therapy. **International Journal of Ozone Therapy**, v. 12, p. 174-176, 2013.

HINRICHS, K., CUMMINGS, M. R., SERTICH, P. L., KENNEY RM. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 72-75, 1988.

HINRICHS, K., SPENSELEY, M.S., MCDONOUGH, P.L. Evaluation of progesterone treatment to create a model for equine endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, p. 456-461. 1992.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2020**. Rio de Janeiro. v. 48, p. 1-12, 2020. Disponível em : <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2020_v48_br_informativo.pdf> Acesso em: 28 de nov. 2021.

JENSEN, E. T. et al. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. **Infection and immunity**, v. 58, n. 7, p. 2383-2385, jul. 1990.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen. **Biology Reproduction**, v. 1, p. 515-518, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1060804/>>. Acesso em: 25 nov. 2021.

KENNEY, R. M. Prognostic value of endometrial biopsy of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 23, p. 347-348, out. 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060804>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

KENNEY, R. M. Cyclic and pathological changes of the mare endometrium as detected by biopsy with a note on early embryonic death. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 172, p. 241-262, 1978.

KENNEY, R. M., DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. (Ed.). **Current Therapy in Theriogenology**. second ed. [s.l.] W.B. Saunders Company, p. 723-730, 1986.

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, n. 3, p.718-724, 1 jun. 2018.

KIRCHHOFF, V. W. J. H. Ozônio e radiação UV-B. São Jose dos Campos: **Transtec**, p. 66, 1995.

KNUTTI, B. et al. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. **Equine Veterinary Education**, v. 12, n. 5, p. 267-270, 5 jan. 2010.

KONIG, H., Liebich, H. **Anatomia dos animais domésticos**. Artmed, Ed.,6° ed., Porto Alegre, p. 429-447, 2016.

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., DZIECIOŁ, M. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 154, p. 56-62, 2015.

LANGONI, H. Abortos infecciosos das éguas. In: XI CONGR. BRAS. REPROD. ANIM., 1995. Belo Horizonte, Minas Gerais, **Anais...** Belo Horizonte, p. 80-88. 1995.

LANGONI, H., ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. SAKAMOTO, C.; SIMON, J.J.; LISTONI, J.F.P.; CARREIRA, E.L.C. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.46, n.6, p.623-636, 1994.

LEBLANC, M.M. Persistent Mating Induced Endometritis in the Mare: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. Recent Advanced in Equine Reproduction. **International Veterinary Information Service**, p. 234-237, 2003.

LEBLANC, M.M. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. **Theriogenology**, v. 70, p. 421-429, 2008.

LEBLANC MM. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, p. 21-27, 2010.

LEBLANC, M. M., ASBURY, A.C., LYLE, S.K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 864-867, 1989.

LEBLANC, M. M., CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 3, suplemento, p. 10-22. 2009.

LEBLANC, M. M., JOHNSON, R. D., CALDERWOOD, M.B., VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Biology Reproduction Mono**, n.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, n. 3 p. 403-12, ago. 2007.

LEBLANC, M. M., MCKINNON, A. O. Breeding the Problem Mare. **Equine Reproduction**. 2^a ed. Editado por Angus O. MvKinnon [et. al.], v. 1. cap. 272, p. 2619-2642. 2011.

LEHMANN, J., ELLENBERGER, C., HOFFMANN, C., BAZER, F. W., KLUG, J., ALLEN, W. R. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1326-1336, 2011.

LEWIS, G.S. Steroidal regulation of uterine immune defenses, **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 281-294, 2004.

LINTON, J.K., SERTICH P. L. The impact of low-volume uterine lavage on endometrial biopsy classification. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1004–1007, 2016.

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

LUKES P., CLUPEK M., BABICKY V., JANDA V., SUNKA P. Stratospheric ozone depletion, **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science**, v. 29, p. 769-776, 2006.

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

MAH, T. F. C., O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 1 jan. 2001.

MALSCHITZKY E., JOBIM, M.I.M., GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. Endometrite na égua, novos conceitos, **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 17-26, 2007.

MATTOS, R., CASTILHO, L. F. F., MALSCHITZKY, E., Keller, A., Gregory, R. M., Mattos, R. C. Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 521-524, 1997a.

MCCUE, P. M. The Problem Mare: Management Philosophy, Diagnostic Procedures, and Therapeutic Options. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 619-626, 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.

MOREIRA, J. F. E. **Avaliação histopatológica e imuno histoquímica de células inflamatórias no endométrio de éguas sadias e repetidoras de cio em programas de transferência de embriões.** (Tese) - Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2011.

MUSTOE, T. Understanding chronic wounds: A unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. **American Journal of Surgery**, v. 187, n. 5, suplemento 1, p. S65-S70, 2004.

NIELSEN, J. M. Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 510-518, 2005.

NIELSEN, J. M., TROEDSSON, M. H., PETERSEN, M.R., BOJESEN, A. M., LEHN-JENSEN, H., ZENT, W. W. Diagnosis of Endometritis in the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the Endometrium: Comparison of

Results Obtained by Swabs and Biopsies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 1, p. 27-30, 2010.

NIELSEN, J. M., NIELSEN, F. H., PETERSEN, M. R., DYREHOSPITAL, A. Diagnosis of equine endometritis—Microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility. **Pferdeheilkunde**, v. 28, p. 8-13, 2012.

NICO, A.F., GOUVEA, T.V.D., COSTA, R.O. Candidíase vulvovaginal recorrente: uma contribuição ao diagnóstico. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 6, p. 33-41, 1994.

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal. Criteria for the inclusion of diseases, infections and infestations on the OIE list. **Terrestrial Animal Health Code**, p.1-6, 2012.

OLIVEIRA, J. T. C. **Revisão sistemática de literatura sobre o uso terapêutico do ozônio em feridas**. 256 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Enfermagem, Proesa, São Paulo, 2007.

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.

OVERBECK, W., JÄGER, K., SCHOON, H.A., WITTE, T.S. Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus—an in vitro study. **Theriogenology**, v. 79, p.1262–1268, 2013.

PAIVA JÚNIOR, O. L. **Endometrite na égua**. Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, p. 40, 2008.

PAPA, F. O., MELO, C. M., MONTEIRO, G. A., PAPA, P. M., GUASTI, P. N., MAZIERO, R. R. D., MARTIN, I. Equine perineal and vulvar conformation correction using a modification of pouret's technique. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 3, p. 459-464, 2014.

PASCOE, D. R. Observations on 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.

PETERSEN, M. R. et al. Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus in mares with subclinical endometritis. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 1-2, p. 119-125, 2015.

PETRITES-MURPHY, M.B., ROBBINS, L.A., DONAHUE, J.M., SMITH, B. Equine cryptococcal endometritis and placentitis with neonatal cryptococcal pneumonia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 383-386, 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.

REITZENSTEIN, M., CALLHAN, 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.

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.

RIFA, D. E., MUSA, Q. J. V. Ozonoterapia intraarticular en la enfermedad artrósica de rodilla. **Revista Cubana Ortopedia Traumatología, Havana**, v. 19, n. 1, 2005.

RODRÍGUEZ, Z.B.Z., GONZÁLEZ, E.F., LOZANO, O.E.L., et al. **Ozonioterapia em Medicina Veterinária**. 1. Ed. Editora Multimídia, São Paulo, p. 282, 2018

RORATTO, I., BELTRAN, M. P. **Endometrite Equina – Revisão bibliográfica**. Disponível em: <www.revista.inf.br/veterinaria12/revisao/revisao.htm>. Em cache - Similares. Acesso em: 21 de junho de 2019.

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.

SAMARDZIJA, M., TURK, R., SOBIECH, P., VALPOTIC, H., HARAPIN, I., GRACNER, D., DURICIC, D. Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: a review. **Veterinarski Arhiv**, v. 87, p. 363-375, 2017.

SIMEK M., CLUPEK M. Efficiency of ozone production by pulsed positive corona discharge in synthetic air. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 35, n. 11, p. 1171-1175, 2002.

SCOGGIN, C. F. Endometritis: Nontraditional Therapies. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 499–511, 1 dez. 2016.

SHAH, D. et al. Persisters: A distinct physiological state of E. coli. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 53, 12 jun. 2006.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, out. 2002.

STOKER, G., IREL, M.R.C.P.; ENG, M.R.C.S. **The surgical uses of ozone.** The Lancet, v. 188, p. 712, 1916.

STOKER, 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.

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.

SILVA, E. I. C. **Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutivo doas Animais.** Departamento de Agropecuária - Instituto Federal Campus Belo Jardim, Belo Jardim. 16 ago. 2020.

SOARES, C. M. T. **Avaliação ginecológica de éguas receptoras de embrião via diferentes métodos de diagnóstico.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2017.

TAKAKURA, G. S. **Avaliação do efeito da utilização de lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada em éguas** 2020. 56 p. Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

THANOMSUB, B., ANUPUNPISIT, V., CHANPHETCH, S., WATCHARACHAIPONG, T., POONKHUM, R., SRISUKONTH, C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 48, p. 193-199, 2002.

THURLOW, L. R. et al. Staphylococcus aureus Biofilms Prevent Macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6585–6596, 1 jun. 2011.

TROEDSSON, M. H. T. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkund Equine Medicine**, v. 13, n. 5, p. 516-520, 1997.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-induced endometritis in mares. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 22, n. 3, p.705-712, 2006.

TROEDSSON, M. H. T. Endometritis. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, D. Varner (Eds.) **Equine Reproduction**. Willey-Blackwell, 2nd ed., p. 2608-2619, 2011.

TROEDSSON, M. H. T.; FRANKLIN, B. K.; CRABO, B. G. Suppression of PMN chemotaxis by different molecular weight fractions of equine seminal plasma. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 15, p. 568–573, 1999.

TROEDSSON, M. H. T., LIU, I. K. M., ING, M., PASCOE, J., THURMOND, M. J. Multiple site electromyographic recording of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of reproduction and fertility suppl.** v. 99, p. 307-313, 1993.

VANDERWALL, D. K., WOODS, G. L. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 8, p. 1108–1110, 15 abr. 2003.

VARGAS, H. et al. Efeitos da infusão de óleos vegetais ozonizados sobre a remoção do biofilme uterino em éguas doadoras de embriões com endometrites persistentes. **I Encontro Científico Internacional de Ozonioterapia**. São Paulo, 28 a 30 de julho de 2019.

VIGLINO, G.C. Ozonioterapia Aplicada a Equinos. São Paulo: **Associação Brasileira de Ozonioterapia**, p.6, 2008.

VILA, A. C. A. **Ozonioterapia no tratamento de endometrite em éguas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2020.

WATSON, E.D. Uterine defense mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: A review. **Equine Veterinarian Journal**, v. 20, p. 107-121, 1987.

WATSON, E.D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal reproduction Science**, v. 60-61, p. 221-232, 2000.

WINGFIELD-DIGBY, N. J.; RICKETTS, S. W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 32, p. 181–185, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6962852>>. Acesso em: 9 nov. 2019.

ZARGARAN, M.; FATAHINIA, M.; MAHMOUDABADI, A. Z. The efficacy of gaseous ozone against different forms of *Candida albicans*. **Current medical mycology**, v. 3, p. 26, 2017.

ZHANG, Y.; WU, Q.; ZHANG, J., YANG, X. Alteration in *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* cells induced by ozone. **Journal of Food Science & Technology**, v. 1, n. 3, p. 106-112, 2016.

ZOBEL, R. Endometritis in simmental cows: incidence, causes, and therapy options. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 37, p. 134-140, 2013.