

ÍRIS JOÃO FIDALGO

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS
E CULTURA MICROBIOLÓGICA DO LÍQUIDO
UTERINO PRÉ E PÓS OZONOTERAPIA EM
QUATRO ÉGUAS PURO-SANGUE LUSITANAS**

Orientador(a): Prof. Doutora Clárisse Simões Coelho

Universidade Lusófona - Centro Universidade Lusófona

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

ÍRIS JOÃO FIDALGO

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS
E CULTURA MICROBIOLÓGICA DO LÍQUIDO
UTERINO PRÉ E PÓS OZONOTERAPIA EM
QUATRO ÉGUAS PURO-SANGUE LUSITANAS**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona - Centro Universidade Lusófona, no dia 30 de março 2023, perante o júri, nomeado pelo despacho de nomeação nº 207/2023, 17 de março de 2023, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Ramilo David, por delegação da Prof^a. Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof^a. Doutora Joana Simões

Orientador(a): Prof^a. Doutora Clarisse Simões
Coelho

Universidade Lusófona - Centro Universidade Lusófona

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

“Eu não sei o que quero ser, mas sei muito bem o que não me tornar.”

– Friedrich Nietzsche

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Aos docentes, aos funcionários e à diretora do nosso curso, Professora Doutora Laurentina Pedroso. Pela vossa dedicação e ânimo em formar os próximos colegas.

À minha orientadora e coorientador, Prof. Dra. Clarisse Simões Coelho e Prof. Dr. Vinicius Ricardo Cuña de Souza, pela sua orientação e na realização desta dissertação. Por toda a sua devoção, amizade, confiança, por todo o conhecimento transmitido, por toda a paciência e disponibilidade em levar este projeto ao seu merecido potencial.

A toda a equipa da Unidade Clínica da Coudelaria Alter Real da Universidade de Évora, por me terem recebido neste estágio curricular e ajudado na realização deste projeto, sem a vossa ajuda não era possível. À minha orientadora externa, Prof. Dra. Elisa Bettencourt por transmitir os seus conhecimentos, pela oportunidade de realizar este projeto. Às minhas Docs, pela amizade, por ensinarem e reensinarem vezes sem conta, pela confiança e pelo efeito que tiveram no desenvolvimento pessoal e profissional, muito obrigada.

A todos os funcionários e direção que trabalham na e para a Coudelaria Alter Real, obrigada pelos dias passados, pelas pequenas pausas para café e por toda a amizade. E, também agradecer pela oportunidade de realizar este projeto nesta grande casa com história.

À minha família, aos meus pais Joaquim e Zélia por nunca terem desistido do meu/nosso sonho por mais árduo que tenha sido e, em tempo difíceis, sem vocês nada disto era possível, adoro-vos incondicionalmente. Ao meu irmão Tiago, colega de casa e psicólogo nos momentos críticos, apoiante em momentos de desespero, ambos desesperámos, mas estamos quase a conseguir. À minha dramática irmã Anaís, obrigada pela paciência em aturar a irmã mais velha e pelo apoio incondicional. A toda a minha família, apesar de tudo não desistimos.

Ao meu namorado, Henrique, apareceste na melhor fase e em tempo difícil. És o que a universidade me trouxe de melhor, obrigada por estares sempre presente nos bons e maus momentos e por me encorajares a seguir em frente. Só sabe desistir aquele que não sonha, ainda temos muitos pela frente.

Às minhas companheiras, Bóris e Morti, apesar de tudo, vocês, também foram e são importantes. Sem o vosso apoio, teria sido difícil de continuar. A vida é curta e, por isso, agradeço por terem estado presentes nesta etapa.

Às minhas amigas e colegas, Ana e Regina, obrigada por todo o apoio e transmissão de ensinamentos, teria sido difícil sem a vossa ajuda enfrentar cada aventura.

A todos os professores que lecionaram, ajudaram e transmitiram os seus conhecimentos durante o percurso, muito obrigada.

E, por último, ao Miko e à Nigiri, por fazerem muita falta.

Resumo

Na reprodução equina, a falha gestacional acontece com alguma frequência causando uma grande perda econômica e genética para a indústria equina. Como tal, a busca por outras terapias além da convencional tem vindo a aumentar, destacando o uso da ozonoterapia. Esta, é uma medicina integrativa de baixo custo que tem vindo a demonstrar benefícios terapêuticos desde a Primeira Guerra Mundial até aos dias de hoje.

Atualmente, existe literatura que afirma que o uso de lavagens intrauterinas com ozono tem sido uma opção muito benéfica para o tratamento de patologias reprodutivas tanto em mulheres como nos animais.

Com o presente estudo, pretendeu-se avaliar os efeitos da lavagem uterina com solução fisiológica NaCl 0,9% ozonizada sobre as características citológicas e cultura microbiológica do líquido uterino em éguas com mais de 15 anos. Para tal, fez-se a administração de solução fisiológica NaCl 0,9% ozonizada na concentração de 52 µg de O₃/mL de oxigénio via uterina, recolhendo posteriormente o líquido administrado por gravidade, observando assim as características citológicas e os microorganismos presentes na cultura microbiológica.

Segundo os resultados obtidos, observou-se um aumento momentâneo da inflamação durante o tratamento com ozono na maioria das éguas, porém, duas semanas após o tratamento, houve uma melhoria no grau de inflamação bem como na diminuição de agentes microbianos na cultura microbiológica.

Desta forma, conclui-se que a ozonoterapia tem um efeito terapêutico benéfico na redução do quadro de inflamação uterina, bem como no controlo de agentes microbianos, minimizando possíveis resistências bacterianas, adotando assim um papel importante no que toca à melhoria dos índices reprodutivos.

Palavras-chave: Reprodução equina, Ozonoterapia, Lavagem uterina, Características citológicas, Cultura microbiológica.

Abstract

In equine reproduction, gestational failure happens with some frequency causing a great economic and genetic loss for the equine industry. As such, the search for other therapies besides the conventional one has been increasing, highlighting the use of ozone therapy. This is a low-cost integrative medicine that has been demonstrating therapeutic benefits from the First World War to the present day.

Currently, there is literature that states that the use of intrauterine washes with ozone has been a very beneficial option for the treatment of reproductive pathologies in both women and animals.

The present study aimed to evaluate the effects of uterine lavage with ozonized saline solution on the cytological characteristics and microbiological culture of the uterine fluid in mares over 15 years old. To this end, 0.9% ozonated NaCL saline solution was administered at a concentration of 52 µg of O₃/mL of oxygen via the uterine route, subsequently collecting the administered liquid by gravity, thus observing the cytological characteristics and microorganisms present in the culture. microbiological.

According to the results obtained, there was a momentary increase in inflammation during ozone treatment in most mares, however, two weeks after treatment, there was an improvement in the degree of inflammation as well as a decrease in microbial agents in the microbiological culture.

In this way, it is concluded that ozone therapy has a beneficial therapeutic effect in reducing uterine inflammation, as well as in controlling microbial agents, minimizing possible bacterial resistance, thus adopting a significant role in terms of improving reproductive indices.

Keywords: Equine reproduction, Ozone therapy, Uterine lavage, Cytological characteristics, Microbiological culture.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

® - Marca registada

AIES – Anti-inflamatórios esteróides

AINES – Anti-inflamatórios não esteróides

AM – Meio *MacConkey*

AS – Meio agar de sangue

C3 – Componente 3 do complemento

C5 – Componente 5 do complemento

DSTs – Doenças sexualmente transmissíveis

ECC – *Score* condição corporal

EDC – Endometrite degenerativa crónica

EI – Endometrite infecciosa

EIAP – Endometrite induzida pelo acasalamento persistente

Et al. – E outros, da locução latina “*et alli*”

G – Gauge

GC – Grupo de controlo

GO₃ – Grupo de ozono

IA – Inseminação artificial

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

iNOS - Óxido nítrico-sintase
LBV – Lavagem de baixo volume
LR – Lactato de Ringer
MAE – Membro anterior esquerdo
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
mL - mililitros
mm – milímetros
NO – Óxido nítrico
NK – *Natural killer*
O₂ - Oxigénio
O₃ - Ozono
PLO - Produtos da lipoperoxidação
PMNs - Neutrófilos polimorfonucleares
PRP – Plasma rico em plaquetas
PRR - Recetores de reconhecimento de patogénicos
PSL – Puro-Sangue Lusitano
p.v. – Peso vivo
ERO – Espécies reativas de oxigénio
RNA – Ácido ribonucleico
RPM – Rotações por minuto
TGFβ - Fator crescimento beta
Th – *T helper*
TNF-α - Fator de necrose tumoral α
TNF-γ – Interferão γ
UI – Unidades Internacionais

Índice Geral

Índice de Tabelas	10
Índice de Figuras.....	11
Casuística de estágio	12
I – INTRODUÇÃO	17
1.1 Anatomia Reprodutiva.....	19
1.1.1 Anatomia Macroscópica do Útero.....	19
1.1.2 Histologia Uterina.....	19
1.2 Endometrite.....	20
1.2.1 Fisiopatologia e Mecanismos de Defesa Uterinos.....	22
1.2.2 Agentes Causadores de Endometrite.....	28
1.3 Diagnóstico	31
1.3.1 Citologia Endometrial	32
1.3.2 Microbiologia Endometrial.....	34
1.3.3 Cultura da Lavagem Uterina	35
1.4 Tratamentos	36
1.4.1 Ozono	38
II - DESCRIÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS	42
1. Objetivo	42
2. Materiais e Métodos	42
2.1 Caracterização da Amostra	42
2.2 Recolha e Processamento da Amostra.....	43
2.3 Preparação da Solução Fisiológica NaCl 0.9% Ozonizada	47
3. Resultados.....	47
4. Discussão.....	54
5. Conclusão	58
6. Referências Bibliográficas.....	59
Anexos.....	I

Índice de Tabelas

Tabela 1. Resultados citológicos e microbiológicos do grupo de controlo (GC).....	50
Tabela 2. Resultados citológicos e microbiológicos no grupo tratado com ozono (GO ₃)	51
Tabela 3. Parâmetros de avaliação macroscópica do líquido uterino recolhido do GO ₃ durante o tratamento com ozono.....	53

Índice de Figuras

Figura 1. Casuística total do estágio curricular na Unidade Clínica e Reprodutiva da Universidade de Évora na Coudelaria Alter Real, dividida por área clínica.....	12
Figura 2. Casuística das principais afeções acompanhadas no estágio curricular na Unidade Clínica e Reprodutiva da Universidade de Évora na Coudelaria Alter Real, dividida por caso clínico.....	13
Figura 3. Fotografias do estágio: a) Uveíte recorrente do olho esquerdo; b) Penso realizado pela autora; c) Corpo estranho retirado do MAE; d) Pré-molares 105 e 205 (dentes de lobo); e) Conteúdo recolhido da lavagem uterina; f) Placenta.....	15
Figura 4 Visão geral da dinâmica das citoquinas endometriais em éguas resistentes e suscetíveis à endometrite desde 0h até 24h após o acasalamento.....	26
Figura 5 Imunologia - Linfócitos T CD4: Th1 e Th2.....	28
Figura 6 Líquido uterino da égua A.T após cada LBV com O ₃ nos dias 1 (d ₁), 2 (d ₂) e 3 (d ₃)	53
Figura 7 Líquido uterino da égua B.T após cada LBV com O ₃ nos dias 1 (d ₁), 2 (d ₂) e 3 (d ₃)	53
Figura 8 Líquido uterino da égua C.T após cada LBV com O ₃ nos dias 1 (d ₁), 2 (d ₂) e 3 (d ₃)	53
Figura 9 Líquido uterino da égua D.T após cada LBV com O ₃ nos dias 1 (d ₁), 2 (d ₂) e 3 (d ₃)	53

Casuística de estágio

O estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária e que deu origem ao presente trabalho realizou-se na Unidade Clínica da Universidade de Évora na Coudelaria Alter Real, em Alter do Chão. O mesmo decorreu entre novembro de 2021 e abril de 2022, perfazendo um total de seis meses, sob orientação da médica veterinária, Prof. Dra. Elisa Bettencourt e com a colaboração das restantes médicas veterinárias da equipa: Dr.^a Helena Guimarães, Dr.^a Inês Bessa de Carvalho e Dr.^a Madalena Cardoso.

Durante o estágio, a autora foi supervisionada pelas quatro médicas veterinárias da equipa na sua prática clínica na Coudelaria de Alter, tendo a oportunidade de acompanhar uma grande variedade de casos clínicos e observar diferentes abordagens diagnósticas e terapêuticas. Neste contexto, foi também possível auxiliar e realizar procedimentos veterinários. Ao longo de seis meses (920 horas), onde foram acompanhados um total de 146 casos, sendo que a grande maioria dos casos pertencentes aos animais efetivos da coudelaria. A partir do mês de janeiro até ao final de abril a autora teve também a oportunidade de acompanhar casos reprodutivos na Unidade Reprodutiva da Coudelaria.

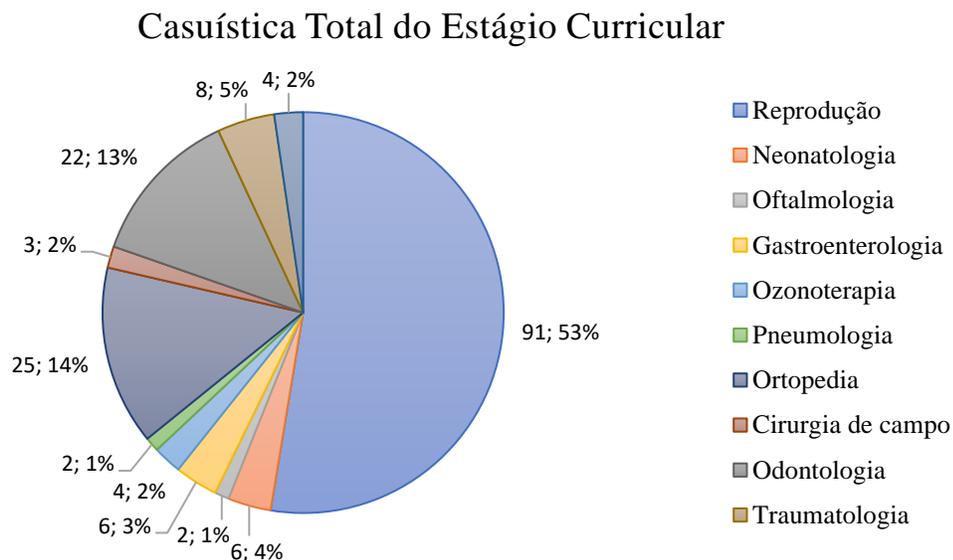


Figura 1 Casuística total do estágio curricular na Unidade Clínica e Reprodutiva da Universidade de Évora na Coudelaria Alter Real, dividida por área clínica.

Casuística Principais Afeções do Estágio Curricular

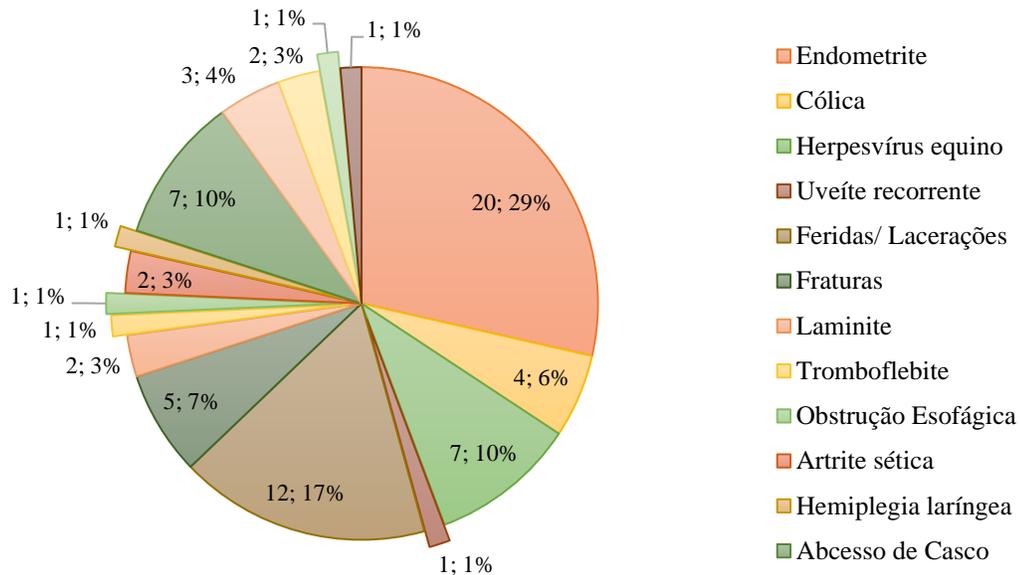


Figura 2 Casuística das principais afeções acompanhadas no estágio curricular na Unidade Clínica e Reprodutiva da Universidade de Évora na Coudelaria Alter Real, dividida por caso clínico.

Na Unidade Reprodutiva da Coudelaria, como pode ser observado no Gráfico 1, foi acompanhado uma grande afluência de casos. Grande parte da casuística do estágio curricular foi na área de reprodução, destacando-se a retenção placentária e a endometrite. Como representando no Gráfico 2, a endometrite apresenta uma grande percentagem de casos reprodutivos que a autora pode acompanhar, desde auxiliar na preparação da lavagem uterina, administrar 10 a 25 UI ocitocina pela via intramuscular na tábua do pescoço, preparar o tratamento intrauterino e auxiliar na administração do mesmo. A autora teve oportunidade de acompanhar o início da época reprodutiva do efetivo da Coudelaria Alter Real, mas também de animais do exterior, no qual realizou vários procedimentos como exame reprodutivo, palpação transretal, ecografia transretal, administração de hormonas e outros fármacos, preparação do garanhão para a colheita, colheita de sémen, preparação da vagina artificial, preparação assética da região perineal da égua, inseminação artificial, processamento do sémen fresco, processamento do sémen para congelação, lavagens uterinas, preparação de amostras citológicas para envio, tratamento intrauterino com sulfato de gentamicina 1 a 2 gramas cada 24 horas tamponada com bicarbonato de sódio (8,4%). A autora ainda teve a oportunidade de visualizar medição de placentas através da ecografia e obter duas

placentas para pesagem e estudo da anatomia da placenta e, de acompanhar a medição condição corporal das éguas antes e após o parto bem, como, nas colheitas de sangue e colostro para a medição de imunoglobulinas para observar se houve transferência de imunidade passiva da mãe para o poldro, resenha de poldros, colocação de microchips e escumação das éguas e dos poldros. Também teve a oportunidade de realizar lavagens uterinas com ozono a uma concentração de 52µg O₃/mL em quatro éguas para o projeto abrangido pelo tema da presente dissertação.

Na área de neonatologia, a autora teve a oportunidade de realizar enemas num poldro com retenção do mecônio, observar a administração de oxitetraciclina diluída (10 mg/kg/p.v.) no soro fisiológico NaCl a 0,9% pela via intravenosa e a realização de transfusão de plasma num poldro com contratura dos flexores dos membros anteriores, acompanhar dois neonatos órfãos que necessitavam de alimentação em turnos de 3 em 3 horas, e, ainda participar num caso de uma poldra com edema causado por uma artrite séptica por trauma na região do codilho do membro anterior direito.

Na área ortopédica (Figura 1), é possível observar um elevado número de casos que envolveram equinos desde equinos de alta competição, início de carreira, poldros e éguas reprodutoras. Assim sendo, foi possível participar em exame locomotores, incluindo as diferentes técnicas de diagnóstico, como realização do teste pinça de cascos, flexões e bloqueios anestésicos com o auxílio do programa *Lameness Locator*, radiografia e ecografia; e auxiliar nas várias modalidades de tratamento, como, artrocentese para administração de corticosteroides, ácido hialurónico e medicamento homeopático (Traumeel), mesoterapia, laserterapia e crioterapia. E, ainda, participar na reabilitação destes equinos dependendo do estado de progressão. O acompanhamento contínuo dos casos contribuiu para a consolidação de conhecimentos sobre cada patologia do aparelho locomotor, destacando conflito dorsal dos processos espinhosos, abscessos de casco, osteoartrite, osteocondrose, fratura do boleto e da terceira falange, desmíte, laminite, patologia do aparelho podotrocLEAR.

Na Unidade Clínica, a autora teve a oportunidade de assistir e participar na indução anestésica e auxiliar na anestesia e atuar como instrumentista de duas orquiectomias, um dos animais apresentava um dos testículos na zona abdominal e o outro equino a nível inguinal. Ainda, houve a oportunidade de remoção de um corpo estranho no membro anterior esquerdo proximal ao

carpo. Após as orquiectomias a autora participou no pós-cirúrgico dos animais através de exames clínicos, administração de penicilina via intramuscular, anti-inflamatório intravenoso e, no caso da remoção do corpo estranho, a realização de um penso até ao antebraço com a colocação de um “donut” no acessório do carpo com função de proteger e aliviar a pressão.

A área de odontologia equina é, também, uma área com prática frequente na coudelaria, e de extrema importância para a manutenção da saúde e bem-estar dos equinos. Nesta área importa destacar a correção de pontas de esmalte, ganchos, rampas dentárias e a extração do primeiro pré-molar 105 e 205.



Figura 3 Fotografias do estágio: a) Uveíte recorrente do olho esquerdo; b) Penso realizado pela autora; c) Corpo estranho retirado do MAE; d) Pré-molares 105 e 205 (dentes de lobo); e) Conteúdo recolhido da lavagem uterina; f) Placenta.

Foram observados vários casos de traumatologia, destacando-se na Figura 2, feridas, onde a autora teve a oportunidade de participar na sua limpeza e desinfeção e, quando necessária a

colocação de penso. Para além disso, ocorreu uma laceração profunda dos ligamentos extensores do membro que terminou posteriormente com a eutanásia do equino. Ainda com alguma casuística oftálmica, destacou-se um caso de obstrução do canal nasolacrimal e uveíte recorrente equina, no qual o tratamento consistiu em administrar uma gota de colírio no olho esquerdo com intervalo de cinco minutos entre cada administração, com a seguinte sequenciação anticolinérgico, antibiótico e antifúngico três vezes ao dia de quatro em quatro horas. Com menos ocorrência, o acompanhamento das urgências limitou-se a quatro casos de síndrome de abdómen agudo, um caso por impactação parasitária e os restantes por impactação gástrica.

Além dos casos clínicos acompanhados, os estagiários tinham o dever de iniciar a realização do exame físico e do procedimento de reabilitação aquando da chegada da equipa médica veterinária, preparar a medicação e auxiliar na arrumação e organização do stock da Unidade Clínica e Reprodutiva. Ainda, tratar dos equinos mais idosos da coudelaria, nomeadamente, passear, escovar, limpar os cascos e tratar da dermatite na zona da quartela. Todas as terças-feiras de manhã, os alunos de Medicina Veterinária da Universidade de Évora chegavam para terem a sua semana de aulas práticas e teórico-práticas de equinos. A equipa veterinária passava os casos da semana anterior aos alunos e davam as aulas sobre diversos temas. A autora teve a oportunidade de participar e assistir a estas aulas durante o período de estágio curricular. Uma vez por semana e de acordo com a disponibilidade e coordenação da equipa veterinária era realizado um *Journal Club*. Por sua vez e no âmbito do tema deste trabalho, a autora teve, a oportunidade de estruturar e apresentar um *Journal Club* relativo a vários estudos sobre o uso da ozonoterapia em equinos, com foco na reprodução.

A realização do estágio curricular em questão permitiu assim à autora entender a logística da coudelaria, bem como a rotina em relação à prática clínica e reprodutiva e, permitiu a realização do projeto sobre o uso ozonoterapia na lavagem uterina em éguas reprodutoras. Desta forma, foi possível, reforçar e aplicar na prática conhecimentos adquiridos no curso de Medicina Veterinária, dando destaque às disciplinas de Patologia Clínica e Médica, Propedêutica Médica, Anatomia, Fisiologia, Obstetrícia e Reprodução, Parasitologia, Citologia e Histologia, Anatomia Patológica e Clínica de Animais de Companhia e Equinos.

I – INTRODUÇÃO

Na Europa, o setor da produção equina possui um impacto económico total de 100 mil milhões de euros por ano, que inclui, 7 milhões ou mais equinos, 6 milhões de hectares de pastagem permanente destinada aos equinos, criação de 800.000 empregos a tempo inteiro e um aumento de 5% anual de cavaleiros (European Horse Network, 2021). Atualmente, em Portugal, a criação de cavalos da raça Puro-Sangue Lusitano tem vindo a crescer, sendo uma das atividades cruciais para o desenvolvimento de determinadas regiões do Alentejo.

Entretanto, em comparação com outras áreas da produção animal, a indústria da criação de equinos tem demonstrado ser o setor menos eficiente, em relação ao ponto de vista económico e genético. Contudo, de acordo com os dados revistos por Squires (2019) ao longo do tempo e com o auxílio da intervenção médico-veterinária e o acompanhamento do estado reprodutivo da manada tem sido priorizado e aperfeiçoado de forma a maximizar a eficácia reprodutiva.

Sob o ponto de vista económico, a principal característica fisiológica para que haja êxito na reprodução de equinos, consiste na aposta da criação de reprodutores que possuam uma boa fertilidade, com a finalidade de melhorar a eficácia do sistema de reprodução e, naturalmente, obter uma maior rentabilidade das explorações. No entanto, existem vários fatores que podem afetar a fertilidade de uma exploração, nomeadamente, genética, sazonalidade, manejo, nutrição, sanidade geral e reprodutiva (Aurich & Aurich, 2006).

Das várias patologias reprodutivas que afetam as éguas, a endometrite é a doença que ocorre com mais frequência e, tem um grande impacto negativo sobre os índices reprodutivos de uma exploração. Para os criadores, uma égua reprodutora que não consegue produzir descendência torna-se frustrante e dispendiosa, e por efeito, causa perdas no valor genético de um sistema reprodutivo (Pasolini *et al.*, 2016).

A endometrite é uma inflamação aguda, crónica ou degenerativa do tecido que reveste o útero, o endométrio, que pode estar associada a infeções bacterianas ou fúngicas (Scoggin, 2016). Por ser uma patologia de alta importância e prevalência nos sistemas criação de equinos, é fundamental o estudo profundo e recorrente de alternativas para o tratamento desta patologia (Bocci, 2006). Assim, dependendo das características do agente causador, o tratamento desta

doença consiste na administração de antibióticos e antifúngicos via tópica e parenteral, como também da associação anti-inflamatórios esteróides (AIES), anti-inflamatórios não esteróides (AINES), mucolíticos, compostos quelantes, plasma rico em plaquetas autólogo, acupuntura e ozonoterapia (Buczowska *et al.*, 2015).

O uso negligente e abusivo de antibióticos é, atualmente, uma preocupação mundial devido ao surgimento e aumento de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos (Mah & O'Toole, 2001). Há uma busca por terapias integrativas para auxiliar no tratamento de afeções, visando restringir o uso de antibióticos somente em situações de real indicação, ou que estimulem e favoreçam condições para que o próprio organismo consiga melhor combater o agente microbiano (Durrani, 2017). Nesse contexto, a ozonoterapia poderia reduzir a necessidade do uso de antimicrobianos, a baixo custo, sem libertação de resíduos e contaminação do meio ambiente (Durrani, 2017).

Desde os anos de 1914 – 1918, a ozonoterapia tem vindo a demonstrar benefícios no tratamento de feridos durante a Primeira Guerra Mundial, tendo sua indicação recomendada até os dias de hoje nas várias vertentes da medicina humana e veterinária (Bocci, 2002). Estudos e publicações científicas que demonstraram a eficiência dos tratamentos com ozono em diversas patologias nas várias espécies têm aumentado de ano para ano (Ávila *et al.*, 2022; Djuricic *et al.*, 2012; Mali *et al.*, 2020; Sharkhuu *et al.*, 2011). À semelhança da medicina humana, as pesquisas desta terapia na medicina veterinária tem vindo a evoluir (Bocci, 2002; Sciorsci *et al.*, 2020). Na área de reprodução animal, foram realizados alguns estudos em bovinos e caprinos de leite em que obtiveram resultados superiores ou semelhantes aos tratamentos convencionais com antibióticos (Đuričić *et al.*, 2016). No entanto, na reprodução equina, apesar de relatos bem sucedidos do uso da ozonoterapia em éguas com falha reprodutiva, ainda não existe literatura concreta sobre os efeitos da ozonoterapia intrauterina em éguas com condições uterinas patológicas, como por exemplo com endometrite (Almeida *et al.*, 2021).

1.1 Anatomia Reprodutiva

O trato reprodutivo da égua encontra-se dividido em duas partes, a externa é constituída pelo períneo, vulva e vestíbulo e, a interna é composta pela vagina, cérvix, útero, ovidutos e ovários (König & Liebich, 2016). Como parte da função reprodutiva, existem outros órgãos que desempenham um papel importante na regulação, como, hipotálamo, glândula pineal, hipófise anterior e retina, ou órgãos que estão associados a esta função como é o caso da glândula mamária (König & Liebich, 2016). Esta secção será dirigida à fração interna do trato reprodutivo e direcionada para o útero.

1.1.1 Anatomia Macroscópica do Útero

O útero da égua apresenta uma forma bicornual sendo, composto pela cérvix o qual é constituída por tecido muscular e conjuntivo, o corpo uterino e dois cornos uterinos derivados da fusão parcial dos ductos paramesonéfricos e unidos pelo ligamento intercornual (König & Liebich, 2016). Na cavidade abdominal e pélvica, o útero, os ovários e os ovidutos estão suspensos pelo ligamento largo que possui uma forma de “T” ou “Y” (Reed *et al.*, 2018). Este ligamento origina-se na região sublombar e possui fibras que vão desembocar para o corpo e colo uterino, esta porção localiza-se unida ao útero e designa-se de mesométrio (König & Liebich, 2016). Este ligamento encontra-se inserido dorsalmente impedindo a retração do útero durante a palpação transretal. Esta particularidade do ligamento na égua dá uma sensação tubular menos distinta em relação aos bovinos (Brinsko & Blanchard, 2011).

1.1.2 Histologia Uterina

O útero é internamente revestido por três camadas, as quais são, do segmento mais externo ao mais interno: camada serosa (perimétrio), camada muscular (miométrio) e camada mucosa (endométrio) (König & Liebich, 2016). O perimétrio é formado por uma camada de células epiteliais escamosas que revestem a superfície externa do trato genital, formando o epitélio peritoneal (König & Liebich, 2016) que, juntamente com a camada muscular longitudinal, possuem

uma vascularização que acompanha o ligamento largo (König & Liebich, 2016). O miométrio é composto por uma camada externa de fibras musculares longitudinais, uma camada muito vascularizada responsável pelo aumento do tônus uterino e uma camada interna de fibras musculares circulares (König & Liebich, 2016; Reed *et al.*, 2018). O endométrio, camada mais interna, é recoberto por células epiteliais cilíndricas que, na sua zona apical, possuem microvilosidades que são sustentadas pela lâmina própria, formada por tecido conjuntivo (König & Liebich, 2016). A lâmina própria possui uma enorme quantidade de glândulas endometriais simples tubulares ou ramificadas que se encontram por todo o endométrio. Esta camada possui nervos, vasos linfáticos e sanguíneos (König & Liebich, 2016). Além de ser formada por células do tecido conjuntivo, tem igualmente neutrófilos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células B e T e células plasmáticas que, por sua vez, migram para o lúmen uterino (König & Liebich, 2016). Posto isto, o endométrio possui uma função glandular e secretora e a sua espessura varia consoante o estado fértil do animal, estando oculto na égua não gestante, devido ao colapso das paredes uterinas e à disposição longitudinal das pregas endometriais na parede uterina (König & Liebich, 2016). Estas pregas longitudinais do endométrio estendem-se até às extremidades dos cornos uterinos através do corpo uterino e continuam através do colo uterino, sendo a sua função ajudar no transporte dos espermatozoides para o oviduto e preparar canais para a remoção de fluídos e detritos após o ato reprodutivo (Reed *et al.*, 2018). O útero é o local onde ocorre a deposição de sémen durante o coito e onde se dá o desenvolvimento do embrião durante a gravidez (König & Liebich, 2016), sendo considerado um ambiente mutável e dinâmico influenciado por hormonas que alteram o seu tamanho, tônus, contratilidade, capacidade imunológica e a atividade secretora glandular (Reed *et al.*, 2018).

1.2 Endometrite

A falha gestacional acontece anualmente em éguas e consiste numa grande perda económica e genética substancial para a indústria equina (Brinsko & Blanchard, 2011; Ferris, 2017; LeBlanc & Causey, 2009). No entanto, a maioria dos problemas relacionados com a infertilidade são complexos e vários fatores, isolados ou combinados, podem causar falhas na produção de descendentes (Overbeck *et al.*, 2011; Pasolini *et al.*, 2016).

Os primeiros estudos que caracterizaram pela primeira vez a inflamação uterina surgiram em 1969, quando Hughs e Loy concluíram que éguas em estro e sem problemas reprodutivos eram capazes de recuperar da inflamação e reestabelecer a homeostase em pouco tempo após a inoculação de colônias de *Streptococcus equi*. Em contrapartida, éguas multíparas, com dificuldade em ficarem gestantes, desenvolviam uma resposta inflamatória prolongada que alterava o aspeto e a consistência do útero à palpação transretal. Atualmente, investigadores e criadores de equinos trabalham arduamente e, de forma direcionada, para individualizar os mecanismos fisiopatológicos que prejudicam o desempenho reprodutivo em éguas (Pasolini *et al.*, 2016). A infertilidade consiste em três tipos de éguas “problema”: as éguas que não conseguem ciclar, éguas que ciclam normalmente, mas não ficam gestantes e éguas que ciclam normalmente e ficam gestantes, mas sofrem de morte embrionária precoce (Overbeck *et al.*, 2011; Pasolini *et al.*, 2016).

A endometrite é a principal causa de subfertilidade em éguas reprodutoras e também a causa mais comum das duas últimas condições referidas anteriormente, sendo definida como uma inflamação aguda, crónica ou degenerativa do endométrio uterino, que pode estar associada a infeções bacterianas ou fúngicas (LeBlanc & Causey, 2009; Pasolini *et al.*, 2016). É uma patologia com uma prevalência de 25 a 60%, sendo frequentemente subdiagnosticada (Diel de Amorim *et al.*, 2016). Tais processos inflamatórios uterinos constituem um dos principais fatores limitantes na fertilidade das fêmeas (Overbeck *et al.*, 2011). Portanto, a identificação da(s) causa(s), o tratamento direcionado e o controlo periódico são constituintes importantes para a resolução do quadro e restabelecimento do ciclo reprodutivo (Pasolini *et al.*, 2016).

A inflamação uterina que decorre após o ato reprodutivo é considerada uma resposta fisiológica usual e transitória, caracterizada pelo rápido influxo de neutrófilos para o lúmen uterino com o objetivo principal de expulsar o excesso de espermatozóides, plasma seminal e bactérias indesejáveis do ambiente uterino (LeBlanc & Causey, 2009; Reilas *et al.*, 2016). Num útero saudável, esta inflamação desaparece em 48 horas (Katila, 1996). Cerca de 90% das éguas conseguem controlar esta inflamação com ou sem intervenção e, como tal, são consideradas éguas reprodutoras normais ou resistentes (Canisso *et al.*, 2020; Troedsson, 2006). Os outros 10% são classificadas como éguas suscetíveis, uma vez, que têm ou são inclinadas a desenvolver endometrites (LeBlanc & Causey, 2009). As éguas suscetíveis são incapazes de resolver a inflamação provocada pelos espermatozóides e acabam por desenvolver endometrite induzida por

acasalamento persistente (Canisso *et al.*, 2020; Causey, 2006; Hurtgen, 2006; Pasolini *et al.*, 2016; Reed *et al.*, 2018). As causas de suscetibilidade abrangem falhas anatómicas e funcionais, instilação de microrganismos patogênicos através da monta natural, resposta imunitária local anormal e o método de reprodução empregado (Pasolini *et al.*, 2016; Reed *et al.*, 2018).

Diel *et al.* (2015) acompanharam 54 éguas positivas para endometrite com base na biópsia endometrial e numa lista de verificação baseada em 5 critérios (achados clínicos anormais, características anormais do líquido recolhido das lavagens de baixo volume (LBV), citologia endometrial positiva, crescimento bacteriano na cultura do *pellet* da LBV e evidência histológica de inflamação na biópsia endometrial). O método de diagnóstico mais sensível para endometrite foi a biópsia endometrial (86%), com a cultura (22%) sendo o método menos sensível. Com base neste estudo, é importante realizar um bom exame físico e associar os achados laboratoriais realizados para avaliação da endometrite em éguas.

1.2.1 Fisiopatologia e Mecanismos de Defesa Uterinos

Existem três principais mecanismos de defesa nas éguas que ajudam a prevenir infecções uterinas, sendo eles as barreiras físicas do trato reprodutivo, o sistema de limpeza mecânica e o sistema imunitário (LeBlanc *et al.*, 2007).

Como barreiras físicas do trato reprodutivo temos a vulva, o esfíncter vestibulovaginal e a cérvix que ajudam a prevenir a entrada de contaminantes, nomeadamente, ar, urina, fezes e microrganismos no útero (Ferris, 2017). Qualquer alteração anatómica destas estruturas aumenta a probabilidade de entrada de bactérias e, conseqüentemente, ocorre a diminuição da taxa de gestação (Tibary & Ruiz, 2018), aumentando o surgimento de placentites e abortos (Satué & Gardon, 2016). Existe uma grande correlação entre a conformação vulvar e a salubridade uterina, isto é, a deficiência na coaptação dos lábios vulvares predispõem à inflamação do endométrio (Hemberg *et al.*, 2005). Conformação, genética, senilidade, peso corporal baixo ou partos consecutivos consecutivos causam aumento da conformação perineal, o que dificulta a drenagem e favorece a conspurcação da vagina devido à entrada de fezes e, acaba por diminuir a taxa de gestação (Satué & Gardon, 2016).

A cérvix é a barreira física entre a vagina e o útero, que relaxa durante o estro, ficando edemaciada e flexível. Conseqüentemente, ocorre o aumento do canal de drenagem, permitindo o funcionamento adequado para expulsão de restos inflamatórios para fora do útero (LeBlanc & Causey, 2009). As alterações anatómicas adquiridas, como divertículos e fibroses, também, impedem o relaxamento e encerramento adequado da cérvix (Katila, 1996). Por isso, uma cérvix disfuncional ou uma drenagem linfática ineficiente pode, também, contribuir para o surgimento desta patologia (Christoffersen & Troedsson, 2017).

Após o encerramento da cérvix, o conteúdo uterino é drenado pelos vasos linfáticos uterinos, drenando o edema e removendo células inflamatórias e partículas presentes no lúmen uterino (LeBlanc *et al.*, 1995). Caso haja diminuição das pressões intraluminais, o sistema de drenagem linfática é ineficiente, permitindo a entrada de fluido para o lúmen uterino ao invés de ascender pelos vasos linfáticos (LeBlanc *et al.*, 1995). LeBlanc e colaboradores (1995) observaram que éguas suscetíveis à endometrite possuíam uma taxa de drenagem linfática diminuída comparativamente às resistentes.

A depuração uterina desempenha um papel importante na resposta deste órgão à contaminação e deficiência na contratilidade do miométrio pode ter uma grande influência na patogênese da depuração uterina tardia (Pasolini *et al.*, 2016).

Alterações nas contrações uterinas ocorrem devido a falhas nos mecanismos físicos de depuração uterina, que estão relacionados com a endometrite instigada pela cobrição e a endometrite infecciosa (Troedsson, 1999). Troedsson *et al.* (1993) observaram que após a inseminação em éguas saudáveis houve um aumento da atividade mioelétrica e das contrações uterinas e, em éguas suscetíveis resultou num atraso de 2 horas e uma diminuição acentuada da atividade, caindo abaixo dos níveis basais 12 horas depois. Como tal, os defeitos na contratilidade miometrial podem estar relacionados com o aumento da acumulação intrauterina de óxido nítrico (NO) através do endométrio de éguas suscetíveis depois da inseminação (Alghamdi *et al.*, 2005), levando ao atraso da limpeza uterina. Portanto, as contrações do miométrio são essenciais para a eliminação eficiente de fluídos e resíduos uterinos (Troedsson, 1999). O sistema inflamatório e a presença de agentes microbianos ativam os neutrófilos a produzirem espécies reativas de oxigênio (ERO) e NO (Woodward *et al.*, 2013). O NO é um mediador inflamatório que incita o relaxamento

muscular e, possui um efeito inibitório na contratilidade uterina da égua, comprometendo a função miometrial e, também é importante na angiogenese e inibição de agregação plaquetária (Alghamdi *et al.*, 2005; Woodward *et al.*, 2013). Assim, éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobrição apresentam uma maior produção de óxido nítrico-sintase (iNOS) no tecido endometrial comparado com éguas resistentes (Alghamdi *et al.*, 2005). A acumulação intrauterina de NO em éguas suscetíveis, concomitantemente com a diminuição da contratilidade uterina provocada pelo NO, constitui um mecanismo subjacente no desenvolvimento da endometrite pós-cobrição (Khan *et al.*, 2015). Para além da diminuição da contratilidade, as éguas suscetíveis expõem um padrão anormal na contração, inviabilizando a eliminação do conteúdo, visto que ocorre de forma inversa àquela observada em éguas resistentes, nas quais a contração começa no corno uterino em direção à cérvix (Woodward *et al.*, 2013).

O sistema mucociliar é composto por muco e cílios que exercem um papel essencial na proteção e limpeza superficial das mucosas. As alterações endometriais patológicas advêm de modificações estruturais da superfície do epitélio como a carência de células ciliadas e da integridade da barreira mucosa, facilitando a aderência de agentes patogénicos (Causey, 2006). No endométrio, o epitélio mucociliar é composto por pregas que formam canais de drenagem que continuam com as pregas cervicais, auxiliando na eliminação do muco pelo movimento ciliar (Katila, 1996). O fluxo apropriado e a viscosidade do muco previnem a adesão e colonização do epitélio por microorganismos e expulsão estes microorganismos e as células inflamatórias uterinas, através da cérvix (Causey, 2006; LeBlanc & Causey, 2009). A produção exagerada de muco está relacionada com falhas na conceção. Na endometrite aguda decorre um aumento da produção deste e no tamanho das células epiteliais e, na endometrite crónica pode haver perda epitelial, perda da camada de muco, modificação da arquitetura do lúmen e aumento da adesão de bactérias. Posto isto, estas alterações podem favorecer para a persistência de infeções uterinas (Causey, 2006).

Nos casos em que o ambiente uterino é invadido, o sistema imune inato é ativado e ocorre a ativação de recetores de reconhecimento de patogénicos (PRR) durante a inflamação, infeção e dano tecidual (Kawai & Akira, 2010). A resposta é estimulada, nomeadamente, por macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), células dendríticas, células do estroma e do epitélio endometrial (Kawai & Akira, 2010). Segundo Troedsson (1997), os PRR ligam-se às imunoglobulinas, nomeadamente IgG e IgM, que estimulam o sistema complemento pela via

clássica através C3 e C5 (Bocci, 2006). Esta ativação da cascata do sistema complemento promovem a formação de prostaglandinas E e F2 α , leucotrienos e outros constituintes originários do ácido araquidônico que agem como agentes de quimiotaxia para os neutrófilos (Pycock & Allen, 1990). Os neutrófilos estão em abundância no sangue periférico, sendo demasiado sensíveis a agentes quimiotáticos, tal como os produtos que advêm da clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) que executam uma função importante na fase precoce das reações inflamatórias (Pycock & Allen, 1990).

Tal qual as bactérias, os espermatozóides, o plasma seminal e outros componentes do ejaculado são também considerados originadores de inflamação após a cobrição, ou seja, quanto maior a quantidade de um destes componentes mais intensa será a resposta leucocitária (Christoffersen & Troedsson, 2017; Gomes *et al.*, 2019). Esta resposta permite a eliminação do excesso do ejaculado e promove a recuperação do lúmen uterino estéril após a cobrição (Christoffersen & Troedsson, 2017). No entanto, o plasma seminal possui um efeito modulatório desta resposta, colaborando no transporte de espermatozóides viáveis, sem anular a fagocitose dos neutrófilos às bactérias e espermatozóides não viáveis (Palm *et al.*, 2008; Troedsson, 2006).

Em 2013, Woodward e colegas observaram que éguas suscetíveis e resistentes apresentaram um aumento considerável na transcrição e na libertação citoquinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e IL-10 seis horas após a inseminação, considerado um momento crítico para o desenvolvimento de EIAP. A IL-6 é uma citoquina pró-inflamatória que modula a libertação de outras citoquinas pró-inflamatórias, nas primeiras 6 horas após a inseminação em éguas resistentes. Já a citoquina anti-inflamatória, IL-10, em éguas resistentes coordena entre as citoquinas pró e anti-inflamatórias no sistema de defesa uterino (Woodward *et al.*, 2013).

Exemplificado no Figura 3, estudos realizados por Fumuso e colaboradores (2003 e 2006) concluíram que ocorre um aumento de citoquinas pró-inflamatórias, nomeadamente do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) em todas as éguas estudadas; no entanto, nas éguas suscetíveis, o nível basal da expressão do RNA mensageiro (mRNA) para tais citoquinas foi mais elevado quando comparado com as resistentes (Fumuso *et al.*, 2003). Ainda, observaram o incremento da expressão do mRNA para IL-8, que detém uma função quimiotática para os neutrófilos, diminuindo a expressão de IL-10 que imunomodula a

resposta inflamatória controlando possíveis danos nos tecidos (Fumuso *et al.*, 2006; Wojtysiak *et al.*, 2020), respetivamente. Assim, a resposta pró-inflamatória é determinada pela libertação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e quimiocina IL-8 (Fumuso *et al.*, 2003, 2006; Palm *et al.*, 2008; Woodward *et al.*, 2013).

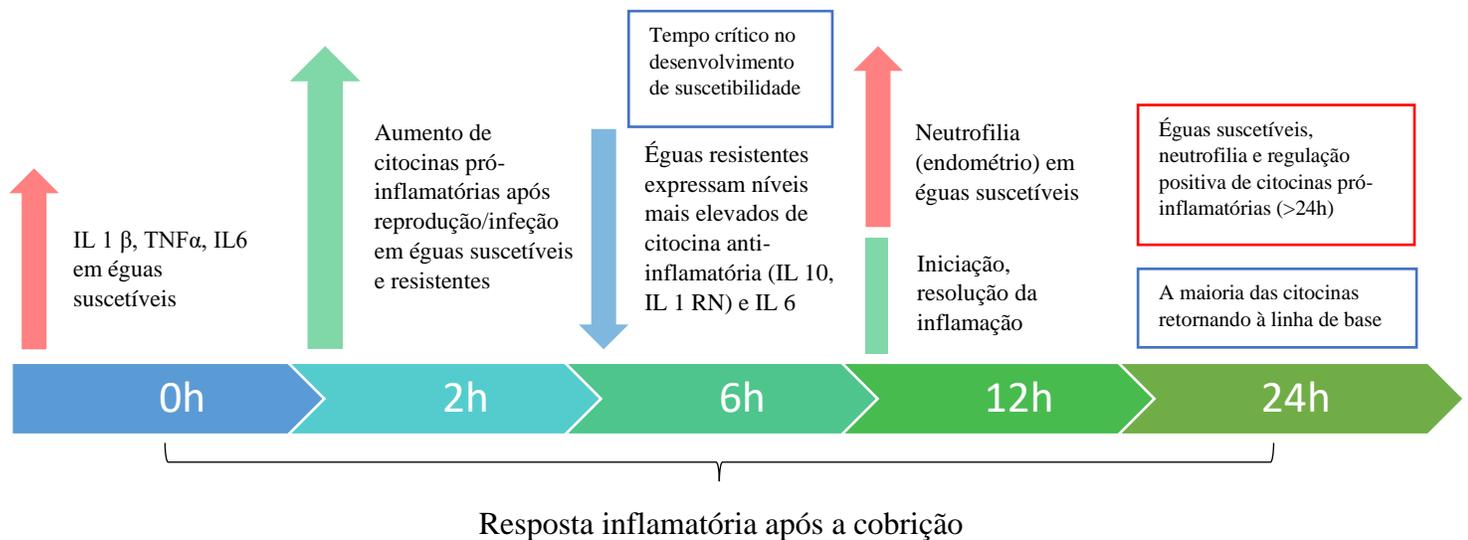


Figura 4 Visão geral da dinâmica das citocinas endometriais em éguas resistentes e suscetíveis à endometrite desde 0h até 24h após o acasalamento. (Adaptado de Canisso, 2020)

Com o avançar da idade reprodutiva, as éguas podem desenvolver alterações no sistema imunitário, anatómicas ou processos degenerativos que interferem na drenagem, sobretudo, partos consecutivos, cobrições repetidas, má conformação vulvar e perineal, fibrose periglandular, linfangiectasia, útero pendular, incapacidade do esfíncter vestíbulo vaginal, degeneração vascular, alongamento do canal vaginal, incompetência cervical, aparelho mucociliar comprometido que resultam de uma drenagem ineficiente, e, conseqüentemente, pode ocorrer a acumulação de fluido uterino, facilitando a entrada de microorganismos (LeBlanc, 2008; Pycocock & Allen, 1990). Christoffersen *et al.* (2015) concluíram que endometrites causadas por *Streptococcus zooepidemicus* estão associadas ao número de partos, idade avançada e má conformação vulvar.

Além da idade, o número de partos aumenta a gravidade das lesões vasculares. Esteller-Vico *et al.* (2012) descreveram que éguas múltiparas com mais de 15 anos têm uma maior

possibilidade de exibir degenerescência vascular moderada a grave quando comparadas com éguas mais jovens e nulíparas. Por conseguinte, éguas suscetíveis que apresentam degenerescência vascular podem ter a perfusão tecidual e o fluxo sanguíneo uterino diminuídos devido à presença fibrose, elastose, fibrose perivascular, fibroelastose da parede vascular e processos de calcificação (Esteller-Vico *et al.*, 2012). Portanto, é essencial uma sustentação sanguínea eficiente para que haja quantidades apropriadas de hormonas, substâncias inflamatórias e neurotransmissores no tecido endometrial. A degenerescência vascular causa perturbações na drenagem uterina diminuindo o retorno venoso dos seios capilares (LeBlanc & Causey, 2009). Caso aconteça uma diminuição da drenagem ou a inflamação perdurar, pode ocorrer a evolução de um edema endometrial patológico, caracterizado por linfangiectasia persistente, que resulta na diminuição da fertilidade e num aumento da resposta inflamatória (LeBlanc & Causey, 2009).

Durante o estro, há hormonas predominantes que interferem na imunidade uterina. Num estudo realizado por Evans *et al.* (1986), éguas acíclicas tratadas com estrogénio conseguiram restaurar o equilíbrio uterino após a inoculação de colónias de *Streptococcus zooepidemicus*. Em contrapartida, éguas tratadas com progesterona não conseguiram combater os agentes patogénicos e com grande quantidade de fluído infeccioso acumulado no útero. Como representado no Figura 5, éguas sob o efeito da ação da progesterona possuem um predomínio do perfil TH2, que resultou na produção de uma fator imunomodulador produzido pelos linfócitos periféricos que restringiram a secreção de citocinas IL-3, IL-4 e IL-10, diminuindo a ação das células *natural killers* (NK) e inibindo as citocinas TH1 de perfil pró inflamatório (Fumuso *et al.*, 2003; Wojtysiak *et al.*, 2020). Por conseguinte, se existir qualquer alteração nos mecanismos de defesa a colonização de agentes patogénicos é facilitada, tornando este processo infeccioso crónico (Katila & Ferreira-Dias, 2022).

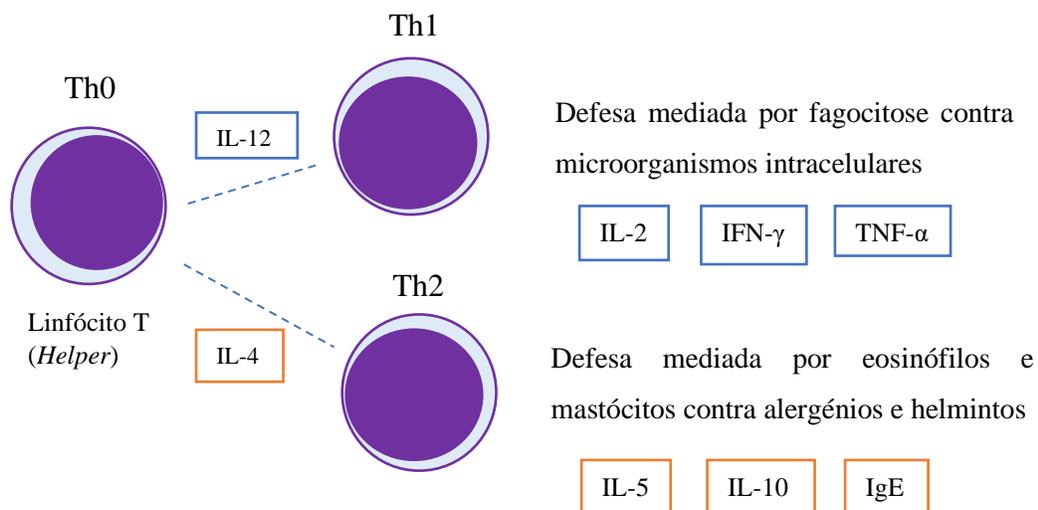


Figura 5 Imunologia - Linfócitos T CD4: Th1 e Th2. (Adaptado de Brunno Câmara, 2019)

1.2.2 Agentes Causadores de Endometrite

Sendo o principal motivo de infertilidade em éguas, a endometrite é uma inflamação do endométrio com etiologia multifatorial que pode ser classificada como: endometrite induzida pelo acasalamento persistente (EIAP), endometrite infecciosa (EI), endometrite degenerativa crónica (EDC) e as doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), reforçando que estas afeções podem ocorrer em conjunto (Christoffersen & Troedsson, 2017; Reed *et al.*, 2018). Existe uma relação entre a EIAP e a EI e, como referido anteriormente, um complexo de fatores relacionados com a égua, tal como idade, conformação perineal, capacidade cervical e a *clearance* uterina, e outros fatores relacionados com microrganismos, tal como indução da inflamação, viscosidade da secreção, aderências epiteliais e resistência à fagocitose, que contribuem para a patogenia da endometrite (LeBlanc & Causey, 2009; Pasolini *et al.*, 2016; Troedsson, 2006).

A EI desempenha um papel relevante na subfertilidade equina (Brook, 1985; Riddle *et al.*, 2007), principalmente, quando ocorre a colonização por bactérias, fungos e microrganismos patogénicos ou oportunistas no útero (LeBlanc & Causey, 2009; Overbeck *et al.*, 2011; Troedsson, 2006). Os agentes patogénicos associados com maior frequência à falha reprodutiva em éguas são a *Escherichia coli* e *Streptococcus* beta hemolítico (β -strep), sendo causadores de endometrite aguda e crónica (Albihn *et al.*, 2003; Canisso *et al.*, 2016; Christoffersen *et al.*, 2015; Frontoso *et*

al., 2008; Trotter & McKinnon, 1988). Corroborando com tal afirmação, Overbeck e colegas (2011) isolaram colônias e obtiveram cerca 54,5% e 45,5% de *Escherichia coli* e *Streptococcus zooepidemicus*, respectivamente. Os agentes patogênicos menos frequentes são referenciadas *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella spp.*, *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* (Christoffersen *et al.*, 2015). Estes microorganismos são detetados por microbiologia (Ferris, 2017; Hurtgen, 2006; Reed *et al.*, 2018).

Individualmente, cada bactéria tem a capacidade de expressar a sua patogenicidade, possuindo várias formas de evasão e, consoante a resposta imunitária subsequente. *E. coli* aderem à superfície do tecido endometrial, impedem a sua remoção física e provocam sinais usualmente subtis, estando associados à repetição dos cios (Shah *et al.*, 2006). Já nas endometrites causadas por *S. β-hemolítico*, há uma produção anormal de muco que se intromete na capacidade fagocitária dos neutrófilos exibindo sinais clínicos mais graves, como, corrimento vaginal e a acumulação de líquido (LeBlanc & Causey, 2009). Foi demonstrado que o *S. zooepidemicus* vive em estado de latência, invadindo e sobrevivendo no interior das células epiteliais das mucosas. Causa infecções recorrentes e permanentes, tornando as éguas resistentes à terapia tradicional (Petersen *et al.*, 2015; Skive *et al.*, 2017).

Estudos revelaram que a persistência da infecção depende da forma de vida dos agentes patogênicos, ou seja, segundo os investigadores existe a forma planctónica e de biofilme. Na forma planctónica, as bactérias estão isoladas e em suspensão e, por consequente, são mais propensas à ação do sistema imunitário e dos antimicrobianos. Os biofilmes, exemplo *Pseudomonas aeruginosa*, são constituídos por colônias de bactérias especializadas, formadas por um tipo microorganismo ou vários, que permitem a partilha de material genético, que aceleram a resistência aos antibióticos e aumentam a taxa de sobrevivência destas colônias (Ferris, 2017; Mah & O'Toole, 2001; Stoodley *et al.*, 2002). A formação destes biofilmes é a causa mais frequente da persistência de infecções e o maior desafio no tratamento de endometrites bacterianas em éguas (Ferris *et al.*, 2016; Mah & O'Toole, 2001; Shah *et al.*, 2006; Thurlow *et al.*, 2011).

Os fungos são os microorganismos menos comumente associados à endometrite (1-5%) que podem ocorrer isoladamente ou em associação com as bactérias (Albihn *et al.*, 2003; Dascanio *et al.*, 2010). Os fungos e as leveduras, respectivamente, o *Aspergillus spp.* e a *Candida spp.*, são os

gêneros mais comuns; no entanto existem outras espécies menos frequentes, como por exemplo, *Mucor spp.* (Dascanio *et al.*, 2010; Ferris, 2017; Hinrichs *et al.*, 1992). Alterações anatômicas, contaminação ambiental por fungos, infecções bacterianas, presença de focos de necrose causados por isquemia ou traumas, histórico de uso repetido de antibióticos intrauterinos ou uso da progesterona (que reduz a capacidade de fagocitose dos neutrófilos) favorecem o desenvolvimento de agentes patogênicos oportunistas no trato reprodutivo, predispondo a endometrites fúngicas (Ferris, 2017; Hinrichs *et al.*, 1992; Stout, 2008; Dascanio *et al.*, 2010).

Na prática clínica reprodutiva, a EIAP acontece em éguas que exibem deformações anatômicas ou fisiológicas que decorrem devido a acumulação excessiva de líquido intraluminal e/ou comprometimento dos mecanismos da limpeza uterina (Reed *et al.*, 2018). É habitual encontrar uma quantidade vestigial de fluído anecoico em éguas normais/resistentes que pode ser detetado através da ecografia transretal nas 24 a 36 horas após a monta natural. Em contrapartida, as éguas suscetíveis mostrarão uma maior quantidade, superior a 1 cm de profundidade, de fluído ecogénico intracavitário (Kidd *et al.*, 2014). Este fluído resulta da acumulação de secreções uterinas, células inflamatórias e sémen. Por isso, é frequente a presença de edema endometrial anormal que serve como indicador de que está a acontecer uma resposta inflamatória local exagerada (Reed *et al.*, 2018).

A EDC é um processo que está associado com a idade da égua. Acontecem diversas mudanças no trato reprodutivo da égua relacionadas com EDC que ocorrem separadamente da história reprodutiva passada ou da paridade (Pasolini *et al.*, 2016). Existem estudos recentes que estimaram dados de três zonas dissemelhantes do mundo com grandes projetos reprodutivos na raça puro-sangue (Scoggin, 2015). Para esse fim, em média, a eficácia reprodutiva das éguas reprodutoras vai aumentando de forma contínua sensivelmente até aos 10 anos de idade e permanece estável até atingir os 14 anos (Scoggin, 2015). Éguas que apresentem EDC são diagnosticadas por biópsia endometrial (Buczowska *et al.*, 2014). Nos achados é comum encontrar-se linfangiectasia, aumento da fibrose e distensão glandular cística, todavia em termos clínicos, essas alterações podem colocar éguas em risco de EI e EIAP. Além disso, as mudanças relacionadas com a idade podem ocorrer em outras partes anatômicas importantes do sistema reprodutor, como o colo uterino e o períneo (Brinsko & Blanchard, 2011; Reed *et al.*, 2018).

É importante, referir as DSTs nos equinos, uma vez que a metrite contagiosa equina, *Taylorella equigenitalis*, é uma patologia nativa na Europa, onde foi estudada uma forma mais insidiosa e com mínimos sinais clínicos (Walter *et al.*, 2012). A metrite contagiosa equina é a doença venérea que sucede em cervicite, vaginite e endometrite (Canisso *et al.*, 2016). Os garanhões portadores assintomáticos desta bactéria transmitem-na às éguas, que após uma semana da cobrição apresentam uma descarga vaginal mucopurulenta. As DSTs ainda incluem certos sorotipos não específicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Canisso *et al.*, 2020; Marth *et al.*, 2016). Ambas residem na genitália externa do garanhão, e são transmitidas pelo coito, IA com sémen infetado ou manuseamento do trato genital. As contaminações uterinas por flora oportunista genital e fecal podem provocar infeções durante a manipulação genital e o acasalamento (Beltaire *et al.*, 2012; LeBlanc *et al.*, 2007; Pasolini *et al.*, 2016).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico preciso de endometrite em éguas é um desafio. O desempenho reprodutivo das progenitoras deve ser avaliado com base na história reprodutiva detalhada, exame físico geral e reprodutivo, que inclui avaliação da genitália externa, inspeção vaginal e palpação transretal, avaliação ecográfica do trato reprodutivo, e métodos complementares de diagnóstico, como, citologia, cultura microbiológica e biópsia endometrial (Liu & Troedsson, 2008; Scoggin, 2016).

Segundo LeBlanc & Causey (2009), a história reprodutiva de éguas com endometrite subclínica inclui falhas em conceber, perdas gestacionais precoces e redução no período entre os estros. Na avaliação ecográfica, a acumulação de líquido intrauterino e as características do conteúdo são sinais clínicos sugestivos de endometrite. Estudos indicaram que éguas com endometrite exibem um edema uterino exuberante quando comparado com éguas clinicamente saudáveis (Christoffersen & Troedsson, 2017; Tibary & Ruiz, 2018). Contudo, em casos de endometrite subclínica, a acumulação de líquido intrauterino e a descarga vaginal não são os sinais clínicos mais comumente observados e, por isso, a história reprodutiva e os exames complementares de diagnóstico são cruciais (Liu & Troedsson, 2008). Quando não há sinais clínicos evidentes é necessário a execução de meios de diagnóstico complementares como a citologia, LBV, zaragatoa e biópsia endometrial (Diel de Amorim *et al.*, 2016).

As técnicas empregues na recolha de amostras uterinas são a escova citológica, zaragatoa uterina, LBV e biópsia endometrial (Cocchia *et al.*, 2012; Woodward & Troedsson, 2013). Investigadores compararam as técnicas supracitadas técnicas quanto à qualidade, aptidão de detetar inflamação e celularidade, e a avaliação histológica através da biópsia endometrial foi considerada o *gold standard* no diagnóstico de endometrite (Canisso *et al.*, 2016; Overbeck *et al.*, 2011). Apesar disso, a lavagem uterina e a escova citológica são as principais opções na colheita de amostras, pois abrangem uma grande área uterina e recolhem uma grande quantidade de células intactas, sem causar lesão no endométrio (Cocchia *et al.*, 2012). Para este propósito é essencial a adequada contenção da água e limpeza exímia da área perineal para reduzir o risco de contaminação (Ferris, 2017; Overbeck *et al.*, 2011).

1.3.1 Citologia Endometrial

O exame citológico é uma ferramenta de diagnóstico da endometrite mais utilizada por ser prática, barata, e de avaliação rápida ao microscópio ótico (Canisso *et al.*, 2016; Kozdrowski *et al.*, 2015). Este exame citológico endometrial consiste na colheita de amostras de células uterinas, obtidas a meio do estro. É um exame de rotina realizado em éguas com falha reprodutiva, que permite caracterizar e identificar o grau de inflamação e infeções causadas por bactérias, fungos e leveduras (Buczowska *et al.*, 2014; Canisso *et al.*, 2020; Diel de Amorim *et al.*, 2016; Kozdrowski *et al.*, 2015).

Estudos demonstraram é possível diagnosticar a endometrite na maioria das éguas através da citologia endometrial em confronto à cultura uterina (Canisso *et al.*, 2016; Nielsen, 2005; Riddle *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2012). No entanto, esta técnica fornece informação insuficiente sobre a origem da inflamação, apresentando uma elevada taxa de resultados falsos negativos (Buczowska *et al.*, 2014) que podem ocorrer devido a falha durante a colheita da amostra ou por aumento de viscosidade do muco gerado por mecanismo de defesa de algumas bactérias aeróbias (Overbeck *et al.*, 2011). Assim, a citologia endometrial deve ser executada em conjunto com a cultura uterina, pois a deteção de PMN e de agentes patogénicos é um robusto indicativo de endometrite (Canisso *et al.*, 2016; Cocchia *et al.*, 2012; Overbeck *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2012). Os esfregaços obtidos,

por qualquer técnica de colheita, devem ser colocados a secar ao ar e corados de imediato com uma coloração modificada de *Wright*, como o *Diff Quick* (Overbeck *et al.*, 2011).

Atualmente, não existem *guidelines* específicas dos métodos para avaliar e interpretar a quantificação de PMN presentes (Card, 2005; Cocchia *et al.*, 2012; Riddle *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2012). Todavia, estes métodos de quantificação de PMN devem se adequar em função da técnica usada para a colheita da amostra (zaragatoa, *cytobrush* ou LBV) (Cocchia *et al.*, 2012; Overbeck *et al.*, 2011). Um resultado positivo ao exame citológico é sugestivo de endometrite aguda, mas não há um valor definido indicativo de inflamação (Overbeck *et al.*, 2011). Dependendo dos autores, os valores podem variar entre 1% (Diel de Amorim *et al.*, 2016) e de 3% (Kozdrowski *et al.*, 2015) devido à existência considerada fisiológica de PMN habitantes do endométrio de éguas híidas durante o estro (Card, 2005). A informação da fase do ciclo éstrico quando se obtém a amostra é fundamental, porque permite uma correta interpretação da citologia, sabendo que há a presença de células inflamatórias fisiológicas nas primeiras 12-48 horas após a cobrição ou inseminação (Christoffersen & Troedsson, 2017).

Vários autores recomendam a observação com a objetiva de imersão (ampliação de 1000x) de no mínimo 100 células, de forma a avaliar a percentagem de PMN em relação ao número de células do epitélio uterino (Factor *et al.*, 2019; Kozdrowski *et al.*, 2015). A literatura propõem dois critérios de contagem, a presença de PMN por campo de avaliação (Riddle *et al.*, 2007) e a proporção de PMN em relação às células do endométrio em percentagem (%) sem considerar o número de campos avaliados (Nielsen, 2005). Os sistemas de classificação atuais classificam as amostras citológicas em ausência de inflamação (PMN <5%), inflamação ligeira (PMN 5-15%), inflamação moderada (PMN 15–30%) e inflamação severa (PMN >30%) (Card, 2005; Cocchia *et al.*, 2012; Riddle *et al.*, 2007). Overbeck *et al.* (2011) consideram positivas amostras em que as células PMN representem mais de 2% do total das células endometriais. Riddle *et al.* (2007) escolheram esfregaços de forma aleatória e avaliaram o número de PMNs, avaliando a gravidade da endometrite considerando de 0 a 2 ausência de inflamação, 2 a 5 inflamação moderada e superior a 5 inflamação grave.

A predominância de alguns tipos de células inflamatórias pode ser sugestiva de inflamação crónica (LeBlanc *et al.*, 2007). A presença de eosinófilos é sugestiva de infeções por fungos,

pneumovagina e urovagina (Dascanio *et al.*, 2010). Após a ovulação e caso seja observada >5% PMN, é solicitado uma avaliação clínica e cultura bacteriana a partir da amostra obtida para exame citológico (Diel de Amorim *et al.*, 2016). As particularidades das células coradas fornecem informações importantes; a presença de cocos confirma uma infecção causada por *S. β-haemolyticus*, já a presença de bacilos pode indicar infecções causadas por *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Rua *et al.*, 2018).

1.3.2 Microbiologia Endometrial

O método mais usado no reconhecimento etiológico de endometrites infecciosas é a cultura aeróbia das amostras recolhidas. Tais amostras são cultivadas em ágar de sangue e, normalmente, 24 horas após a incubação a 37°C é avaliado o crescimento, morfologia das colónias e as suas reações bioquímicas (Liu & Troedsson, 2008; Nielsen, 2005; Overbeck *et al.*, 2011). Podem suceder resultados falsos positivos por contaminação da amostra originários do meio ambiente e do trato genital (Buczowska *et al.*, 2014; LeBlanc *et al.*, 2007; Nielsen, 2005; Tibary & Ruiz, 2018). Petersen e colegas (2015) demonstraram que a porção caudal do trato genital possui, fisiologicamente, uma diversidade de microorganismos comensais que incluem a *E. coli* e o *S. zooepidemicus* e Riddle *et al.* (2007) complementaram que a pele também possui microorganismos, como o *Bacillus spp.* e o *Micrococcus spp.*, que podem reduzir a taxa gestacional em éguas inférteis e velhas. Portanto, para diminuir o erro de interpretação, os resultados devem ser interpretados em conjunto com o resultado da biópsia e citologia endometrial (Burlison *et al.*, 2010; Lanci *et al.*, 2022; Woodward & Troedsson, 2013).

Há várias correlações entre a citologia, biópsia e a ecografia do endométrio. Nomeadamente, num estudo realizado por Rasmussen *et al.* (2015), averiguou-se um grau de edema endometrial superior em éguas diagnosticadas com *Streptococcus spp.*. No entanto, o grau de inflamação examinado na citologia pode variar conforme o agente patogénico presente (Riddle *et al.*, 2007);, por exemplo, estes agentes patogénicos, *S. β-haemolyticus* e a *Klebsiella spp.*, estão correlacionados com grande frequência a citologias uterinas positivas, ao contrário da *Pseudomonas spp.*, *E. coli*, e *S. aureus* (Burlison *et al.*, 2010; Riddle *et al.*, 2007; Tibary & Ruiz, 2018).

Os testes de sensibilidade aos antibióticos (TSA) devem ser realizados para delimitar quais antibióticos apropriados e eficazes no tratamento da infecção por determinado agente patogénico (Canisso *et al.*, 2016; Köhne *et al.*, 2020).

1.3.3 Cultura da Lavagem Uterina

A lavagem uterina é um procedimento de colheita de líquido uterino tão competente no isolamento de microorganismos quanto a biopsia endometrial, podendo ser realizada em qualquer fase do estro (LeBlanc, 2010). A lavagem uterina pode ser de baixo volume (60 a 50mL) ou de grande volume (1L), ambas utilizam uma solução estéril de lactato de Ringer (LR) ou solução estéril salina tamponada, no qual se adapta um cateter de lavagem uterina que posteriormente é introduzido no útero, através do cérvix (Ball *et al.*, 1988). Depois este fluído é removido por gravidade para a mesma garrafa (Factor *et al.*, 2019). Sikora e colaboradores (2015) optaram, em alternativa à LBV, a lavagem de grande volume (1L) de forma a aproveitar o líquido da lavagem uterina para tratamento. Depois da colheita, é desinfetada uma zona da garrafa que contém a solução uterina e através de uma agulha é retirado 50 mL para um tubo de *Falcon*. Desta maneira, é um procedimento eficaz na colheita de amostras para avaliação citológica da inflamação uterina. Em qualquer técnica, deve ser administrada ocitocina (10 a 25 UI) para ajudar a recuperar todo o conteúdo uterino, que pode ficar detido nas pregas endometriais (Card, 2005; Cocchia *et al.*, 2012; Ferris, 2017; LeBlanc, 2010; LeBlanc *et al.*, 2007).

Macroscopicamente, o fluído é visualizado à luz e é avaliado a transparência e a quantidade de muco presente no tubo da amostra, sendo classificado em turvo, transparente ou transparente com a presença de fios de muco. A turvação e o muco podem estar relacionados com a presença de *E. coli* e *S. β -haemolyticus* (LeBlanc, 2010; LeBlanc *et al.*, 2007). Após a colheita do fluído uterino, este é centrifugado e, seguidamente, o sobrenadante é excluído com uma pipeta. Por conseguinte, é separado em duas partes, uma para cultura microbiológica e outra pequena porção de sedimento é usada para realizar um esfregaço ou como alternativa para avaliar citologicamente (Ball *et al.*, 1988; Card, 2005; Cocchia *et al.*, 2012; Factor *et al.*, 2019; LeBlanc, 2010; LeBlanc *et al.*, 2007).

A vantagem deste procedimento é a aquisição de uma amostra representativa de uma grande área do lúmen uterino. No caso de éguas com infertilidade crónica que possuem lesões focais é importante a realização desta técnica, uma vez que não se sabe origem da lesão (Nielsen, 2005). LeBlanc *et al.* (2007) demonstraram que a execução de culturas das lavagens uterinas possuem o dobro da sensibilidade comparando com as culturas das zaragatoas uterinas (Nielsen, 2005). No entanto, esta técnica tem a desvantagem de ficar material extra, o tempo de processamento da amostra e a presença de uma grande quantidade de células distorcidas. A centrifugação da amostra, pode dificultar a identificação e a observação de determinadas células, uma vez que ocorre a acumulação de muco e detritos (Cocchia *et al.*, 2012). Durante a manipulação transretal e a colocação do cateter no útero pode ocorrer irritação da mucosa do endométrio, aumentando o risco de infeções iatrogénicas resultando em culturas falso positivas (Cocchia *et al.*, 2012; Ferris, 2017; LeBlanc *et al.*, 2007). Atualmente, já existe uma técnica de LBV com dupla proteção, com maior especificidade e sensibilidade que reduz o risco de contaminação (Christoffersen *et al.*, 2015).

1.4 Tratamentos

Atualmente, o uso de antibióticos ainda se mantém para tratamento ou profilaxia de endometrites através de infusões intrauterinas locais ou por via sistémica (Hurtgen, 2006; Machado *et al.*, 2015). O uso de antimicrobianos deve ser prudente, isto é, deve ser iniciado quando existe um diagnóstico ou provas clínicas para começar o tratamento. Revisões recentes enunciam que o uso profilático de antibióticos intrauterinos é discutível e, que o uso de tratamentos alternativos conseguiria ser mais proveitoso (Scoggin, 2016).

A seleção de um antifúngico ou antibiótico sistémico deve ser fundamentada nos resultados dos testes de sensibilidade e deve atingir concentrações eficientes no endométrio e noutros locais do trato urogenital, de modo a evitar ou reduzir a ocorrência de possíveis resistências (Ferris, 2017; González *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 2018). Para auxiliar no enfraquecimento do processo patológico, a literatura descreve administração de compostos quelantes, mucolíticos, AINEs e AIEs, plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo (Pasolini *et al.*, 2016), acupuntura

(Buczowska *et al.*, 2015; Scoggin, 2016) e lavagens uterinas com solução ozonizada (Ferreira *et al.*, 2021).

Nos casos em que as alterações conformacionais sejam a causa primária de contaminação uterina opta-se pela correção cirúrgica como nos casos de vestibuloplastias que aumentam a taxa de gestação e impedem recidivas (Inoue & Sekiguchi, 2017).

As lavagens uterinas são usadas de forma estratégica por vários autores como tratamento em éguas suscetíveis à endometrite após a cobertura. Existem várias opções de soluções antissépticas que podem ser usadas neste procedimento, como a iodopovidona, clorexidina, peróxido de hidrogénio e solução salina hipertónica diluídas em LR ou solução salina (NaCl 0,9%) que são colocadas no útero e, de seguida drenadas (Buczowska *et al.*, 2015; Scoggin, 2016). No entanto, estas soluções são altamente irritantes e por isso não devem ser usadas rotineiramente para não causar lesões endometriais (Satué & Gardon, 2016). A infusão uterina com PRPs pode ser realizada pré e pós a IA para controlo inflamatório em éguas suscetíveis à EIAP e aumentar a taxa de gestação (Segabinazzi *et al.*, 2017).

Atualmente, profissionais optam por usar imunomoduladores estrategicamente para diminuir a linfangiectasia e a resposta neutrofílica após a inseminação. Investigadores realizaram estudos que consistiram na administração de 0,1 mg/kg de acetato de 9-alfa-prednisolona e 50 mg de dexametasona por via intramuscular, e em ambos resultou num aumento na taxa de gestação (Bucca *et al.*, 2008; Dell'Aqua *et al.*, 2006). Friso *et al.* (2019), administraram no dia da indução da ovulação firocoxib por via oral na dose de 0,2 mg/Kg, para controlar reações inflamatórias uterinas sem que interfira na drenagem uterina e na ovulação. Os ecbólicos, ocitocina e cloprostenol são usados para induzir contrações uterinas que ajudam na drenagem uterina (Pycock & Allen, 1990). A dose recomendada de ocitocina varia entre 10 a 25 UI, deve ser administrada via intramuscular ou intravenosa. Se a dose administrada for maior que 25 UI ocorre a redução da taxa de gestação (Knutti *et al.*, 2010). É importante referir que a ocitocina não é eficiente na maioria das éguas com líquido intrauterino, uma vez que há fatores que podem afetar a eficiência, tal como cérvix fechada, menor número de recetores endometriais, útero pendular e doses exageradas, que podem promover uma disfunção na contração uterina (Tibary & Ruiz, 2018).

O exercício físico favorece o bem-estar do animal e promovendo a melhoria da circulação sanguínea e linfática do trato reprodutivo e a nível muscular melhora a configuração perineal fortalecendo, conseqüentemente, as barreiras físicas contra a introdução de agentes patogênicos no sistema reprodutivo (Scoggin, 2016). Brendemuehl e colaboradores (2014) demonstraram que uma dieta suplementada com ômega-3 afeta a produção de citocinas, diminuindo a resposta inflamatória após a inseminação. Quando éguas suscetíveis com EIAP não são tratadas de forma adequada, o problema persiste e pode se tornar num processo patológico crônico (LeBlanc, 2010).

1.4.1 Ozono

O ozono é obtido a partir de 95-99% de oxigênio medicinal sendo considerado um gás instável (Bocci, 2006). Este gás é produzido por uma máquina especial que modifica o oxigênio (O₂) em ozono (O₃) (Bocci, 2006). Existem relatos referentes à utilização desta terapia, preliminarmente por Wolff e, posteriormente, por Tesla nos anos 40 durante a Primeira Guerra Mundial em água ozonizada no tratamento de gangrenas e feridas (Hayashi & Friolani, 2018; Stoker, 1916). As moléculas de O₃ decompõem-se com facilidade em moléculas de O₂ e, por isso não formam resíduos (Bocci, 2006). O ozono reage à maioria das substâncias orgânicas e inorgânicas formando ligações duplas e triplas, sendo essas substâncias complexos lipoproteicos plasmáticos da membrana celular, aminoácidos e proteínas (Bocci, 2002; Sagai & Bocci, 2011).

O ozono promove a ativação de linfócitos e monócitos e incita a produção de citocinas como as interleucinas IL-1, IL2 IL-6, interferões e fator crescimento beta (TGFβ) (Bocci, 1992). As interleucinas IL-1 e IL-6 estimulam os hepatócitos a produzirem fibrogênio, do qual reagente de fase aguda e precursor de fibrina que contribui para a homeostasia e regeneração tecidual. A interleucina IL-2 desperta a proliferação e a diferenciação de células T em células de memória, instigando a proliferação e ativação de células NK e B a originarem anticorpos. Os interferões incentivam a resposta antiviral, ampliando a expressão de MHC-I e MHC-II (Abbas, 2015) e, portanto, o ozono serve como imunoestimulante.

A ozonoterapia desempenha um papel relevante na patogenia das doenças, especialmente na produção de aldeídos, ozonídeos, peróxidos e peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) que advêm da

reação com os fosfolípidos da membrana. A nível celular este gás atua nos tecidos e fluídos biológicos (sangue, plasma e urina), interagindo com moléculas de DNA e resíduos de cisteína de proteínas. Possuindo igualmente ação mensageira na ativação de enzimas, mediadores químicos e resposta imunitária (Scwhartz & Martínez-Sánchez, 2012). Este gás dissolve-se nos fluídos biológicos; não obstante os antioxidantes destes fluídos anulam uma quantidade considerável de O₃. É crucial a correta administração relativamente às quantidades e concentrações para que se possa formar espécies reativas de O₂ (ROS) e produtos da lipoperoxidação (PLO). O H₂O₂ e outros mediadores propagam-se nas células, ativando vários mecanismos metabólicos a nível eritrocitário, leucocitário e plaquetário que produzem efeitos biológicos positivos (Sagai & Bocci, 2011). Posto isto, o H₂O₂ é o ERO mais importante por ser um oxidante não radical (Bocci *et al.*, 2005), que dispõem uma ação sinalizadora celular e mensageira na libertação de doses terapêuticas de ozono (Martínez-Sánchez *et al.*, 2005).

O uso da ozonoterapia é caracterizado pela sua simplicidade de aplicação, boa tolerância dos pacientes, efetividade, e quando aplicada adequadamente possui baixa ocorrência de efeitos adversos (Viebahn-Hänsler *et al.*, 2016). Dentre suas atividades, destaca-se inativação de microorganismos, estímulo do metabolismo do oxigénio a nível tecidual, efeito anti-inflamatório (oxida determinados mediadores pré-inflamatórios), promoção analgésica (consegue oxidar alguns mediadores da dor), propriedades regenerativas (a nível plaquetário liberta fatores de crescimento característicos), sendo comumente empregue no tratamento de lesões musculares e cutâneas (de Souza *et al.*, 2021; Hayashi & Friolani, 2018). Estudos realizados *in vivo* por Re e colaboradores (2014) comprovaram que o ozono, em baixas doses, ativa o fator nuclear Nrf2, incumbido pela ativação da transcrição de genes e formação de enzimas antioxidantes e substâncias citoprotetoras. Há evidências que a ozonoterapia tem um papel importante no tratamento de tumores, uma vez que as células neoplásicas possuem resistências aos anti tumorais e radioterapia (Menéndez *et al.*, 2008).

Na medicina humana, a ozonoterapia é usada no controlo da dor, no tratamento de perturbações nervosas (Díaz-Soto *et al.*, 2012), na recuperação de nervos (Ozbay *et al.*, 2017), em osteoartrite (Paolucci *et al.*, 2021), para tratar de feridas infetadas por bactérias resistentes aos antibióticos (Rangel *et al.*, 2022), em patologias infecciosas e inflamatórias (Viebahn-Hänsler *et al.*, 2016). Na área cirúrgica possui efeito analgésico, antibacteriano, anti-inflamatório e regenerativo

(Alves *et al.*, 2004). Na medicina intensiva, pode se executar autoterapias e para o tratamento de infecções sistêmicas através da insuflação retal (Hayashi & Friolani, 2018). Viebahn-Hänsler *et al.* (2016) analisaram que 1293 pacientes que usaram ozonoterapia através da autohemoterapia maior e insuflação retal obtiveram efeitos positivos significativos a nível clínico e farmacológico sem efeitos ou reações adversas.

Na Medicina Veterinária, a utilização do ozono é recomendado em lesões musculares e cutâneas em várias espécies (estimula a regeneração tecidual, antibacteriano e anti-inflamatório) (Ferreira *et al.*, 2021; Repciuc *et al.*, 2016), dorsalgias nos equinos (Sconza *et al.*, 2021; Vigliani *et al.*, 2005), lesões tendíneas e ligamentares (através da injeção combinada com outras substâncias ou isolada) (Bocci & Di Paolo, 2009), hérnia discal em cães (Han *et al.*, 2007), e como analgésico (injeção em pontos chave ou insuflação) (Teixeira *et al.*, 2013). O gás pode ser administrado através de insuflações ou lavagens intracavitárias em casos de endometrites, mastites, vaginites, metrites, retenções placentárias e urovaginas em pequenos e grandes ruminantes (Đuričić *et al.*, 2016; Nascente *et al.*, 2019; Repciuc *et al.*, 2016; Sciorsci *et al.*, 2020; Zobel *et al.*, 2012; Zobel & Tkalčić, 2013). Nos equinos, Alves e colegas (2004) estudaram os efeitos do ozono nas lesões de reperfusão do jejuno e ressaltaram a importância da ozonoterapia na vasodilatação periférica, mediada pela ação do NO que evitou lesões no endotélio vascular e da mucosa, favorecendo a recuperação destes.

Atualmente, não há muitos estudos sobre o uso de ozono na reprodução equina. No entanto, já existem relatos da aplicação desta técnica em pequenos e grandes ruminantes (Djuricic *et al.*, 2015; Mali *et al.*, 2020; Zobel *et al.*, 2012). É sabido que pode ser aplicada nas lavagens cavitárias com solução salina ozonizada ou por insuflação gasosa intracavitária (Polat *et al.*, 2015). Desta forma, em ruminantes este procedimento tem apresentado sucesso no tratamento de mastites (Scrollavezza *et al.*, 2002), retenções placentárias de membranas fetais (Djuricic *et al.*, 2012), metrites, endometrites (Scrollavezza *et al.*, 2002), vaginites e urovaginas (Zobel *et al.*, 2012).

Para além desta terapêutica aumentar a eficiência reprodutiva diminui o uso de antibióticos (Djuricic *et al.*, 2015; Zobel *et al.*, 2014). Na fase inicial de endometrite, evita o agravamento e a utilização de antimicrobianos (Samardžija *et al.*, 2017). Demonstrou ser a mais eficiente em tratamentos reprodutivos em comparação com os tratamentos convencionais, sem

presença de resíduos no leite ou efeitos adversos (Szenci *et al.*, 2017; Constantin & Bîrțoiu, 2016; Djuricic *et al.*, 2012; Imhof *et al.*, 2019; Szenci, 2016; Zobel *et al.*, 2012; Zobel & Tkalčić, 2013). Estudos compararam resultados entre o tratamento intrauterino com rifamicina e com ozono em vacas com endometrite subclínica e, concluíram que apesar dos resultados serem idênticos a rifamicina foi detetada no leite ao contrário do ozono (Polat *et al.*, 2015). Num estudo recente, seis éguas com histórico de falha reprodutiva procriaram após o tratamento com ozono (Nascente *et al.*, 2019). Montechiesi e Ignácio (2018) obtiveram sucesso no tratamento de um caso de endometrite por *Pseudomonas spp.* através da insuflação do uterina com mistura de oxigénio e ozono e lavagens uterinas com solução fisiológica ozonizada.

Com base nas informações supracitadas sobre o ozono e endometrite em éguas, este trabalho tem como objetivo principal avaliar os efeitos da LBV utilizando solução fisiológica NaCl 0,9% ozonizada sobre as características citológicas e cultura microbiológica do líquido uterino em éguas com mais de 15 anos.

II - DESCRIÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS

1. Objetivo

O presente trabalho pretende avaliar, de forma descritiva, os efeitos da LBV utilizando solução fisiológica NaCl 0,9% ozonizada sobre as características citológicas e cultura microbiológica do líquido uterino em éguas com mais de 15 anos. Este projeto foi realizado durante a época reprodutiva, mais precisamente entre o início de janeiro de 2022 e final de abril de 2022, em éguas da raça Puro-Sangue Lusitano (PSL), pertencentes à Coudelaria Alter Real, município Alter do Chão, distrito Portalegre, Portugal. As amostras citológicas e a cultura microbiológica obtidas foram processadas e realizadas, respetivamente, no Laboratório de Anatomia Patológica e Laboratório de Microbiologia da Universidade de Évora.

2. Materiais e Métodos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Bem-Estar Animal da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia (CEBEA-ULHT), sendo registado sob o número 12/2022.

2.1 Caracterização da Amostra

Foram incluídas no projeto sete éguas, da raça Puro-Sangue-Lusitano (PSL), reprodutoras com idade média entre 13 e 23 anos (idade média 19 anos com desvio padrão de 3 anos). Estas éguas foram selecionadas pela entidade responsável pela parte reprodutiva da coudelaria, Unidade Reprodutiva da Universidade de Évora, sendo éguas mais velhas saudáveis que, provavelmente, não entrariam na próxima época reprodutiva, entrando na reforma. Foi registado o histórico reprodutivo das mesmas e estas éguas foram examinadas através de palpação e ecografia transretal. A colheita do líquido uterino e o tratamento foram realizados quando os animais se encontravam durante o estro, ou seja, na presença de um folículo dominante e com edema do endométrio. Os animais não tinham suspeita de endometrite subclínica, sendo submetidos ao protocolo terapêutico após apresentarem sinais de estro, e um folículo com mais de 35mm. Além disso, todas foram

consideradas clinicamente híginas após a realização do exame clínico, avaliando os seguintes parâmetros: frequência cardíaca e respiratória, tempo de repleção capilar, temperatura retal, motilidade intestinal e a cor das mucosas. Os animais encontravam-se em regime semiextensivo, uma manada com mais de 60 animais, em pastagem de sequeiro de boa qualidade e recebiam uma vez alimento composto de grande qualidade para as necessidades requeridas durante a gestação, aleitamento e crescimento do poldro e, feno quando vinham para as baias; ao final do dia, regressavam ao campo. Com base na classificação de Henneke *et al.* (1983), a condição corporal (ECC) dos animais selecionados para o presente estudo variava, respetivamente, entre moderadamente magra (4) a moderada (5) em éguas não gestantes ou início de gestação e, éguas que pariram possuíam uma condição corporal moderadamente obesa (6), sendo, portanto, considerado o peso ideal entre 4 a 6 ECC, segundo o anexo I.

2.2 Recolha e Processamento do Líquido Uterino

Das sete éguas utilizadas no estudo, apenas quatro éguas foram designadas para receber o tratamento adjunto da ozonoterapia utilizando através de lavagem uterina com uma solução fisiológica NaCl 0,9% ozonizada, grupo ozonoterapia (GO₃), visando atender os objetivos do projeto e o grupo de controlo (GC), constituído por três éguas, tratado com solução fisiológica NaCl 0,9% para caracterizar o líquido uterino após a lavagem uterina utilizada como prática habitual na coudelaria.

O dia da colheita das primeiras amostras do líquido uterino (d₁) para citologia e microbiologia das lavagens uterinas, foi realizado de forma estéril, usando o cateter de *Foley* introduzido após a cérvix e enchendo o *cuff* com ar, de maneira que este não saísse do útero e a colheita só derivasse do útero. De seguida à colheita, sem retirar o cateter de *Foley*, iniciou-se, de forma estéril, o tratamento com O₃. O tratamento foi repetido durante três dias consecutivos (d₁, d₂ e d₃). No quarto dia (d₄) e 18 dias após (d₁₈), foram colhidas novas amostras de líquido de lavagem uterina para citologia e microbiologia, utilizando uma solução fisiológica NaCl 0,9% não ozonizada estéril, da mesma forma que em d₁ (antes da primeira lavagem uterina usando o ozono).

Para se proceder à colheita das amostras, o animal foi colocado num tronco de contenção, numa área coberta própria, onde se realizava o exame reprodutivo da manada durante a época reprodutiva, protegida e interdita a pessoas alheias. A rabada da égua foi envolvida por uma

ligadura junto à base da cauda e contida lateralmente, evitando a contaminação da região perineal, após a assepsia. A região perineal foi higienizada várias vezes consecutivas através da limpeza com papel embebido numa mistura de água-morna e clorexidina a 2% e, de seguida a secagem da área perineal foi efetuada com toalhas de papel descartáveis. Enquanto era feita a higienização asséptica da região perineal, outro profissional procedia com a preparação estéril do material para a lavagem uterina.

Uma sonda de silicone estéril foi acoplada na extremidade de uma embalagem de solução aquecida de NaCl 0,9%, mantendo livre a outra extremidade da sonda estéril. A essa extremidade foi acoplado o cateter de *Foley* estéril. Em seguida, a extremidade livre do cateter de *Foley* foi posicionada na palma da mão calçada com a luva estéril, de forma a proteger a mesma, minimizando sua contaminação. Após a higienização asséptica da região perineal (anteriormente descrita), o cateter de *Foley* foi introduzido no útero por via vaginal e mantido seguro após atravessar a cérvix pela mão do técnico durante todo o procedimento, para evitar refluxo. Com uma seringa de 20mL acoplada à abertura do cateter *Foley*, injetou-se ar até o *cuff* permanecer totalmente distendido. O técnico verificou se o cateter estava corretamente posicionado à entrada do útero, para que não houvesse passagem de solução fisiológica NaCl 0,9% para o exterior do mesmo. Foi perfundido o conteúdo total de 500 mL de NaCl 0,9% através da sonda e do cateter, e após 1 minuto, o líquido foi drenado por gravidade até recolhido da sua totalidade. Caso isso não fosse possível, era administrada 10 a 25 UI de ocitocina pela via intramuscular para remover o excesso de líquido que tenha ficado retido.

Após a colheita do líquido uterino, este foi devidamente identificado com o nome do animal e a data da colheita, sendo depois encaminhado para o laboratório da coudelaria. No laboratório da coudelaria, a amostra foi imediatamente avaliada macroscopicamente quanto à cor e turgidez e, posteriormente, foi processada para ser enviada para o laboratório de citologia e de microbiologia da Universidade de Évora.

O processamento da amostra foi realizado no laboratório da coudelaria dentro de uma câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool. A embalagem de solução salina NaCl 0,9% foi desinfetada com álcool, seguida da colocação de uma agulha de 18G com uma seringa de 20mL acoplada. Dentro da câmara de fluxo laminar, o líquido foi separado em 2 tubos

de *Falcon* estéreis, colocando 45mL em cada tubo. O tubo para microbiologia foi selado com *parafilm* para impedir o vazamento do líquido durante o transporte. E, posteriormente, colocado no frigorífico; o tubo destinado para citologia foi colocado a centrifugar a 600 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos. De seguida, foi retirado o sobrenadante e o *pellet* restante foi depositado sobre uma lâmina com auxílio de uma zaragatoa. A lâmina foi, então, colocada a secar ao ar, corando com a coloração de *Giemsa* e, por fim, guardada numa caixa adequada para transporte de lâminas, devidamente identificada com data da colheita, nome do animal e destino da amostra (exemplo, citologia).

Todo esse protocolo foi repetido em três fêmeas, também selecionadas pela Unidade Reprodutiva da Universidade de Évora; entretanto, sem que fosse feita as lavagens usando a solução ozonizada (GO₃); nesses animais, que constituíram o grupo controle (GC), foi só realizada uma lavagem uterina com solução de NaCl 0,9% simples pré IA sendo que ficaram gestantes após a inseminação. O material dessa lavagem foi encaminhado para análise citológica e microbiológica.

2.2.1 Avaliação Citológica e Cultura Microbiológica

Na avaliação citológica do esfregaço foram considerados: a percentagem de neutrófilos polimorfonucleares (PMN); o tipo de células presentes (bactérias ou outro tipo de microorganismos / células inflamatórias), o fundo da lâmina (limpo, mucoso); detritos celulares e o grau de microorganismos presentes por campo. Para a avaliar a percentagem de PMN, a literatura recomenda a observação mínima de 1000 células através da ampliação de 1000x com o óleo de imersão, de forma a determinar o grau de inflamação: <5% PMN: ausência de inflamação; 5-15% PMN: inflamação ligeira; 15-30% PMN: inflamação moderada e >30% PMN: inflamação severa (Card, 2005). Por norma, a presença de mais de 5% de PMN por campo, está correlacionada com a presença de inflamação, sendo que a presença de outras células inflamatórias, que não PMN, é sugestivo de inflamação crónica (Card, 2005; Diel de Amorim *et al.*, 2016).

Considera-se a presença de bactérias, fungos ou leveduras, livres e no citoplasma das células fagocitárias, de modo a avaliar o grau da infeção: grau 1: ausência de bactérias em 30 campos; grau 2: 1 bactéria em 30 campos; grau 3: 1 bactéria em 10 campos; grau 4: 2 a 10 bactérias por campo; grau 5: 11 a 50 bactérias por campo (Card, 2005; Maloufi *et al.*, 2002). Esta última

avaliação, é, igualmente, atribuída na presença de fungos e leveduras, sendo fundamental avaliar com uma ampliação de 1000x (Maloufi *et al.*, 2002).

A classificação da presença de detritos celulares, muco e fragmentos celulares, derivou da percentagem presente em um campo de ampliação de 1000x: grau 1: <25%; grau 2: >25% e <50%; grau 3: >50% e <75% e grau 4: >75% (Card, 2005). Graus 3 e 4 são sugestivos de endometrite com possível etiologia bacteriana (Diel de Amorim *et al.*, 2016).

A cultura microbiológica consistiu na identificação de colónias de microorganismos que cresceram em determinado meio de cultura e implicados na infeção. Após a centrifugação do líquido da lavagem uterina é obtido o sedimento. Dentro de uma câmara de fluxo laminar vertical removeu-se o sobrenadante e, de seguida com a ajuda de uma ansa estéril foi removido o sedimento para os meios de cultura agar de sangue (AS) e agar *MacConkey* (AM). As placas de cultura ficaram a incubar a 37°C por 24-48 horas. Na cultura microbiológica, pode-se obter os seguintes agentes etiológicos: aeróbios (*Klebsiella pneumoniae* (cápsula 1, 2 e 5), *Streptococcus zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, anaeróbios, microaerofílico (*Taylorella equigenitalis*) e fungos (*Aspergillus* spp., *Candida* spp. (Díaz-Bertrana *et al.*, 2021; Ravaioli *et al.*, 2022). Nas culturas microbiológicas, é importante considerar o crescimento intenso nas primeiras 24h–48h ou o crescimento exuberante de uma só espécie e a presença de mais do que um microorganismo. No entanto, em culturas mistas com mais de 3 microorganismos este deve ser considerado contaminação (Ravaioli *et al.*, 2022).

Nos meios de cultura AS e AM o crescimento diferenciado e o aspeto das colónias permitem uma identificação hipotética dos agentes infecciosos envolvidos. Como tal, no meio AS é possível observar o crescimento de *Staphylococcus* e *Streptococcus*, que não crescem em meio de cultura AM (Díaz-Bertrana *et al.*, 2021). As colónias de *Streptococcus* crescem mais lentamente e são mais pequenas, comparando com as colónias *Staphylococcus* que são maiores. As colónias de *Staphylococcus*, podem ou não ser hemolíticas, sendo o halo de beta hemólise bem definido, e as colónias de *Streptococcus*, também, se pode observar ou não, hemólise, considerando alfa hemólise quando surge um halo esverdeado ou beta-hemólise quando forma um halo transparente ao redor das colónias (Ravaioli *et al.*, 2022). Relativamente à *Escherichia coli*, esta cresce em ambos os meios de cultura, AM e AS, sendo que no meio AS as suas colónias são grandes e de aspeto

mucoide. Por norma, não são hemolíticas, no entanto em algumas estirpes de *E. coli* pode ocorrer hemólise (Ravaioli *et al.*, 2022).

2.3 Preparação da Solução Fisiológica NaCl 0,9% Ozonizada

As soluções fisiológicas NaCl 0,9% foram ozonizadas através gerador de ozono modelo O&L 1.5 Rm (Ozone&Life®). Uma sonda de silicone estéril foi acoplada à saída do gás de mistura de ozono/ oxigénio, na concentração de 52 µg de O₃/mL de oxigénio obtida através da regulação do fluxómetro de entrada de O₂ em ¼ litro por minuto (L/m) na máxima potência da máquina. A mistura gasosa foi injetada continuamente durante 10 minutos na parte inferior do frasco, de forma que o gás percorresse toda a coluna de solução, sendo libertado da parte superior do frasco através de uma agulha de 18G. Nesse ponto foi acoplado um dispositivo destruidor de ozono, para não haver libertação de O₃ para o ambiente. Após a ozonização, uma seringa estéril de 2mL era acoplada na agulha de 18G da extremidade superior do frasco, visando manter a solução fisiológica NaCl 0,9% ozonizada estéril. Devido à instabilidade do ozono em soluções aquosas, a lavagem uterina era realizada imediatamente após a ozonização da solução.

3. Resultados

Na Tabela 1 estão descritos os resultados citológicos e microbiológicos do GC. Todos os animais do GC exibiram uma inflamação ligeira a moderada. Já na cultura microbiológica, uma égua obteve resultado negativo e as duas restantes apresentaram crescimento de colónias de *Staphylococcus chromogenes* e *Streptococcus uberis*.

Na Tabela 2 está representado o GO₃, em que 4 éguas foram submetidas a LBV com solução fisiológica NaCl 0,9% não ozonizada no dia 1 (d₁), 4 (d₄) e aos 18 dias depois do tratamento com o ozono (d₁₈). Estes dias contém os dados citológicos e da cultura microbiológica dos respetivos dias anteriormente mencionados. No d₁, antes do tratamento com O₃, metade do GO₃ apresentava uma inflamação ligeira a moderada e a outra parte ausência de inflamação. Na

microbiologia, dois dos animais apresentaram cultura negativa e nos outros cresceram colónias de *Sphingomonas paucimobilis* e *Staphylococcus xylosus*.

No d₄, após o tratamento com O₃, metade do GO₃ não possuía inflamação e a restante inflamação severa. Na cultura microbiológica duas éguas obtiveram cultura negativa e as outras éguas obtiveram resultados positivos, sendo que cresceram colónias numa égua um tipo de colónia de *Streptococcus agalactiae* e, no outro animal colónias com três microorganismos diferentes *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

No d₁₈, 18 dias após o tratamento, dois animais do GO₃ apresentavam uma ligeira inflamação e as restantes éguas ausência da mesma. Na cultura microbiológica, todos os animais obtiveram culturas negativas.

A Tabela 3, consta a avaliação e comparação macroscópica de determinados parâmetros do líquido uterino recolhido do GO₃ durante o tratamento com O₃. Durante a colheitas realizadas não se observou a presença de detritos ou de floculação no líquido uterino. No entanto, no d₁ todas as éguas do GO₃ realizaram uma primeira LBV com solução fisiológica NaCl 0,9% e, de seguida outra LBV com solução fisiológica NaCl 0,9% ozonizada para comparar os parâmetros macroscópicos do líquido uterino não ozonizado e ozonizado, denotando que não ocorreram alterações significativas na cor e transparência. Nos d₂ e d₃ todos os animais do GO₃ realizaram uma única LBV com O₃, demonstrando alterações significativas na cor e transparência do líquido uterino durante o tratamento.

Tabela 1: Resultados descritivos da análise citológica e cultura microbiológica do grupo de controlo (GC).

Animal	Avaliação citológica	Cultura microbiológica
A.C	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: 15% - 30% com fagocitose bacteriana; • Bactérias ou outros micro-organismos: grau 3 (pelo menos 1 bactéria em 10 campos); • Detritos celulares: <25% (grau 1). 	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
	<p style="text-align: center;"><u>Conclusão: Inflamação Moderada</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Elementos celulares observados; • Bactérias fagocitadas no interior dos neutrófilos polimorfonucleares. 	
B.C	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: 15%-30% com a presença de células inflamatórias mononucleadas; • Bactérias ou outros micro-organismos: grau 1 (sem bactérias em 30 campos); • Detritos celulares: <25% (grau 1). 	Negativo
	<p style="text-align: center;"><u>Conclusão: Inflamação Moderada</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Sem presença de bactérias; • Poucos detritos celulares; • Presença de células mononucleadas sugere alguma cronicidade. 	
C.C	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: 5%-15%; • Bactérias ou outros micro-organismos: pelo menos 1 bactérias por 30 campos (grau 2), sem fagocitose; • Detritos celulares: <75% (grau 3). 	<i>Streptococcus uberis</i>
	<p style="text-align: center;"><u>Conclusão: Inflamação Ligeira</u></p>	

Tabela 2: Resultados descritivos da análise citológica e cultura microbiológica no grupo tratado com ozono (GO₃).

Animal	Avaliação citológica			Cultura microbiológica		
	d ₁	d ₄	d ₁₈	d ₁	d ₄	d ₁₈
A.T	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: <5%; • Bactérias ou outros micro-organismos: bactérias de contaminação. Sem fagocitose; • Detritos celulares: < 25% (grau 1). 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: < 5%; • Bactérias ou outros micro-organismos: inúmeras bactérias de contaminação, detritos orgânicos e inorgânicos; • Detritos celulares: < 25% (grau 1). 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: <5%; • Bactérias ou outros micro-organismos: sem bactérias significativas (grau 1); • Detritos celulares: <25% (grau 1). 	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Negativo	Negativo
	<p><u>Conclusão: Sem inflamação</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Esfregaço contaminado; • Elevada lise celular. 	<p><u>Conclusão: Sem inflamação</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Presença de células destruídas, lise celular, bactérias de contaminação (bacilos de grandes dimensões), detritos orgânicos e inorgânicos; • Difícil diagnóstico; 	<p><u>Conclusão: Sem inflamação</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Fundo do esfregaço com detritos e gel lubrificante. 			
B.T	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: >30%; • Bactérias ou outros micro-organismos: 2-10 bactérias por campo 1000x (grau 4), com evidência de fagocitose; • Detritos celulares: < 25% (grau 1). 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: < 5%; • Bactérias ou outros micro-organismos: inúmeras bactérias de contaminação, detritos orgânicos e inorgânicos; • Detritos celulares: < 25% (grau 1). 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: 5-15%; • Bactérias ou outros micro-organismos: pelo menos 1 bactéria em 10 campos (grau 3) e com fagocitose pelos polimorfonucleares neutrófilos; • Detritos celulares: <25% (grau 1). 	Negativo	Negativo	Negativo
	<p><u>Conclusão: Inflamação Severa</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Presença de bactérias com valor diagnóstico; 	<p><u>Conclusão: Sem inflamação</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Presença de células destruídas, lise celular, bactérias de contaminação (bacilos grandes dimensões), detritos orgânicos e inorgânicos; • Difícil diagnóstico. 	<p><u>Conclusão: Inflamação Ligeira</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Presença de bactérias com valor etiológico. 			

C.T	<u>Conclusão: Sem inflamação</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: >30%; (fagocitose bacteriana muito marcada) • Bactérias ou outros micro-organismos: grau 4 (2 a 10 bactérias por campo); • Detritos celulares: <50% (grau 2). 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: <5%; • Bactérias ou outros micro-organismos: presença de bactérias de contaminação; • Detritos celulares: < 25% (grau 1). 	Negativo	<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Negativo
		<u>Conclusão: Inflamação Severa</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de bactérias fagocitadas nos neutrófilos polimorfonucleares. 			
D.T	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: 5%-15%; • Bactérias ou outros micro-organismos: pelo menos 1 bactéria por 10 campos (grau 3), com fagocitose pelos neutrófilos; • Detritos celulares: <25% (grau 1). 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: >30%. Presença de macrófagos e fagocitose muito marcada; • Bactérias ou outros micro-organismos: pelo menos 2-10 bactérias por campo (grau 4), com fagocitose pelos neutrófilos; • Detritos celulares: <25% (grau 1). 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos: 5%-15%; • Bactérias ou outros micro-organismos: pelo menos 1 bactéria em 30 campos (grau 2); com fagocitose discreta. • Detritos celulares: <75% (grau 3). 	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negativo
	<u>Conclusão: Inflamação Ligeira</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de bactérias de valor etiológico. 	<u>Conclusão: Inflamação Ligeira</u> <ul style="list-style-type: none"> • Escassa presença de bactérias fagocitadas; • Presença de detritos celulares e eritrócitos. 			

Nota: d₁ – Dia 1, LBV realizada com solução fisiológica NaCl 0,9%, antes do tratamento com O₃; d₄ – Dia 4, LBV realizada com solução fisiológica NaCl 0,9%, após 3 dias de tratamento com O₃; d₁₈ – aproximadamente, duas semanas após o tratamento com O₃.

Tabela 3: Avaliação macroscópica do líquido uterino recolhido do GO₃ durante o tratamento com ozono.

Animal		Presença de detritos ou floculação	Transparência	Cor
A.T	d ₁	-	-	-
	d ₂	-	+	+
	d ₃	-	+	-
B.T	d ₁	-	-	-
	d ₂	-	+	+
	d ₃	-	+	+
C.T	d ₁	-	-	-
	d ₂	-	+	+
	d ₃	-	-	+
D.T	d ₁	-	-	-
	d ₂	-	+	+
	d ₃	-	+	+

Nota: d₁ – Dia 1, LBV realizada com O₃; d₂ – Dia 2, LBV realizada com O₃; d₃ – Último dia de LBV com O₃.; “+” – ocorreu alteração macroscópica do líquido uterino; “-” – não ocorreu alteração macroscópica do líquido uterino.

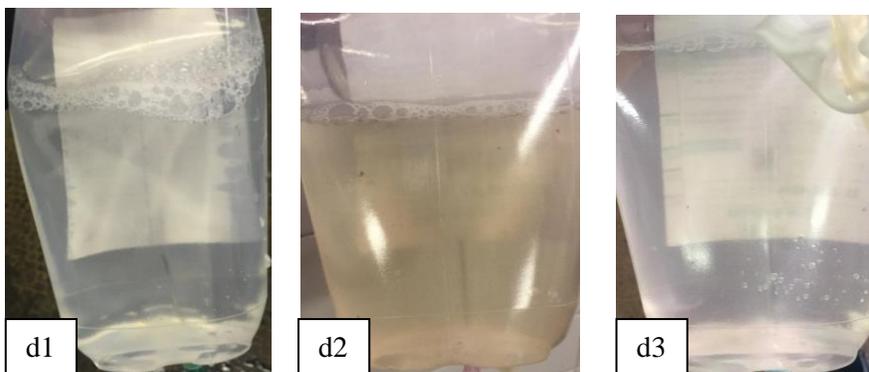


Figura 6: Líquido uterino da égua A.T após cada LBV com O_3 nos dias 1 (d_1), 2 (d_2) e 3 (d_3).

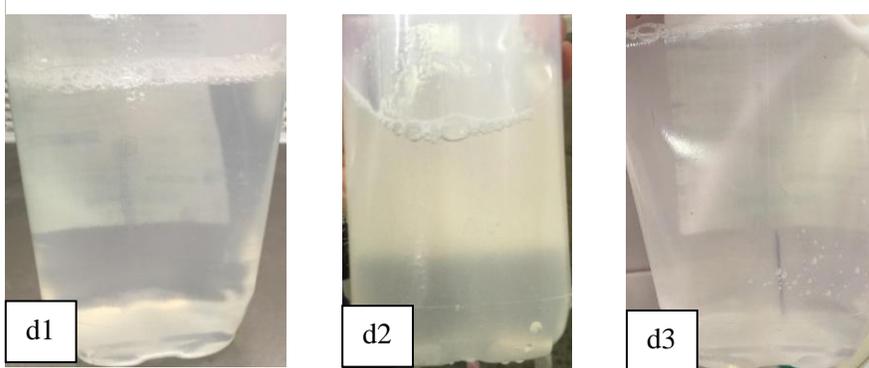


Figura 7: Líquido uterino da égua B.T após cada LBV com O_3 nos dias 1 (d_1), 2 (d_2) e 3 (d_3).

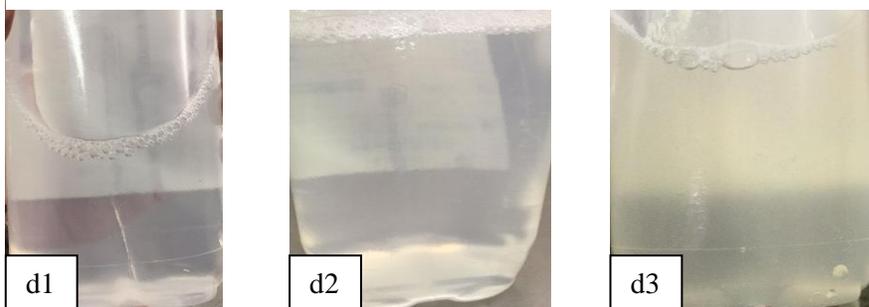


Figura 8: Líquido uterino da égua C.T após cada LBV com O_3 nos dias 1 (d_1), 2 (d_2) e 3 (d_3).

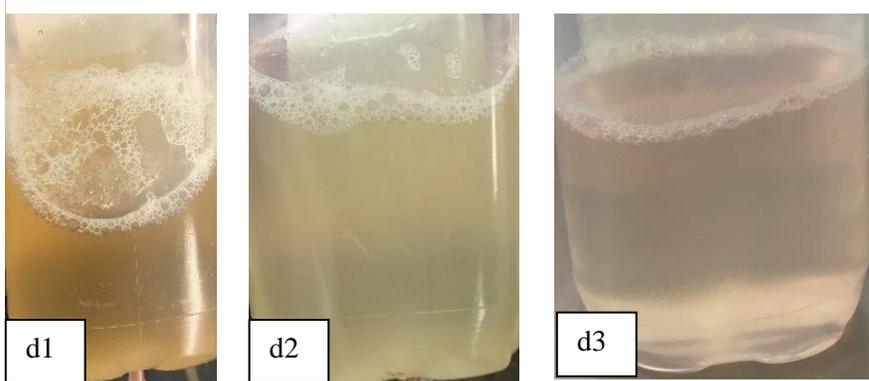


Figura 9: Líquido uterino da égua D.T após cada LBV com O_3 nos dias 1 (d_1), 2 (d_2) e 3 (d_3).

4. Discussão

No presente estudo, pretendeu-se avaliar a reação inflamatória e a ação antimicrobiana do O₃ em ambiente uterino recorrendo a lavagens uterinas ozonizadas em éguas com mais de 15 anos no seu último ano reprodutivo. Para este efeito, realizaram-se lavagens uterinas em três éguas maioritariamente jovens somente com solução fisiológica NaCl 0,9%, grupo de controlo (GC), e lavagens uterinas com O₃ durante três dias consecutivos em quatro éguas com mais idade, grupo teste (GO₃). Para isso, comparou-se os achados obtidos entre GC e GO₃. O uso do ozono tem vindo a ser estudado como uma terapia integrativa para o tratamento de infeções uterinas, principalmente por ser eficaz contra bactérias, fungos e vírus (César *et al.*, 2012; Durrani, 2017; Giuliani *et al.*, 2018), minimizando o desenvolvimento de resistências bacterianas (Giuliani *et al.*, 2018).

Segundo a Tabela 1, as éguas A.C e B.C apresentaram uma inflamação moderada e a égua C.C inflamação ligeira, sendo esta última inflamação considerada normal, uma vez que, a recolha foi realizada quando os animais estavam em estro, portanto, uma resposta fisiológica (Brinsko & Blanchard, 2011). No entanto, a égua B.C demonstrou também a presença de outras células inflamatórias, que não PMN, que sugerem alguma cronicidade, podendo ser caracterizada uma inflamação crónica (Card, 2005; Diel de Amorim *et al.*, 2016). As éguas A.C e C.C apresentaram uma grande quantidade de bactérias por campo no esfregaço citológico, sendo que na égua A.C observou-se fagocitose bacteriana, e, como se pode observar, ambas as éguas obtiveram resultados microbiológicos positivos. De acordo com Card (2005), éguas que possuem aumento nos números de neutrófilos (>5%), bactérias e detritos na avaliação citológica apresentam cultura positiva, o que significa que é necessário intervir. Por último, a elevada percentagem de detritos encontrados no esfregaço da égua C.C. poderá ser sugestivo de endometrite com etiologia bacteriana, uma vez que apresenta um *score* entre 3 e 4 (Diel de Amorim *et al.*, 2016). Como estes animais ficaram gestantes após a realização da primeira lavagem uterina pré inseminação acabaram por não realizar mais nenhuma avaliação citológica. No entanto, segundo Krimer & Miller (2020), éguas saudáveis conseguem eliminar neutrófilos, bactérias e espermatozóides em 12 – 48 horas, considerando que a égua pode ser controlo de si mesma, uma vez que consegue reestabelecer o ambiente uterino sem necessitar de intervenção (Thomson *et al.*, 2022).

Na cultura microbiana das éguas A.C e C.C cresceram colónias de *Staphylococcus chromogenes* e *Streptococcus uberis*, ambos são agentes patogénicos causadores de mastite ambiental na espécie bovina. Estes agentes aparecem com frequência em animais de produção leiteira sendo encontrados maioritariamente no ambiente, podendo também colonizar pele, mucosas, fezes, fomites e material orgânico (Oliver *et al.*, 2011). O *S. chromogenes* é comum em animais mais velhos e com lactações tardias (Plummer & Plummer, 2012). Possivelmente, durante o procedimento de limpeza da área perineal das éguas A.C e C.C, pode ter ocorrido acumulação de sujidade para o interior da vulva e a ponta da sonda ter atingido uma área contaminada ou a limpeza não ter sido bem executada pelo técnico. Atualmente, já existe relatos sobre a composição do microbiota uterino, o que significa que o ambiente uterino não é considerado um ambiente estéril, uma vez que apresenta uma grande variedade de microorganismos (Thomson *et al.*, 2022). Em contrapartida, Malaluang (2021) refere que é necessário aprofundar o conhecimento sobre esses microorganismos e o papel que desempenham no útero das éguas e a sua potencial transmissão para os humanos e ambiente.

Antes do tratamento do GO₃, d₁, apenas as éguas B.T e D.T possuíam inflamação severa e ligeira, respetivamente. De acordo com Card (2005) seria crucial intervir na égua B.T, mesmo não tendo sido observado crescimento no exame microbiológico, porque um ambiente uterino sem inflamação é fundamental para a sobrevivência embrionária. Nas éguas A.T e C.T não foi observada inflamação na citologia. Na cultura microbiológica em d₁, as éguas A.T e D.T obtiveram crescimento de colónias de *Sphingomonas paucimobilis* e *Staphylococcus xylosus*, respectivamente. Nas éguas A.T e B.T no d₄ e na égua C.T no d₁₈, houve contaminação do esfregaço citológico, no entanto, uma vez que não houve crescimento microbiano e possuía dados citológicos aumentados (bactérias bacilares de grandes dimensões, presença de gel lubrificante, detritos e neutrófilos), podendo ser devido a má técnica durante o processamento da lâmina ou durante a colheita da amostra (Card, 2005).

Depois do tratamento, d₄, a égua A.T obteve resultado negativo na cultura microbiológica, mantendo-se sem sinais de inflamação, e a égua B.T teve redução do quadro inflamatório, mantendo-se negativa. Já a égua C.T desenvolveu grave inflamação com presença de bactérias fagocitadas nos PMNs e crescimento de colónias de três microorganismos diferentes, sendo eles *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, agentes etiológicos

comuns na endometrite bacteriana (Gallego Rodríguez *et al.*, 2020; Morris *et al.*, 2020). Similarmente, a égua D.T evoluiu para uma inflamação mais grave com crescimento de colônias de *Streptococcus agalactiae*. A resposta inflamatória após a administração local do ozono é esperada, uma vez que o organismo estimula a produção de PMNs, libertando estes últimos citocinas que ajudam na resposta imunitária. É sabido que a endometrite pode induzir *stress* oxidativo sistêmico em éguas (Abdelnaby *et al.*, 2020). Mazzuchini e colegas (2022) referem que em éguas tratadas com altas concentrações de ozono intrauterino, seis horas após a inseminação, ocorreu uma resposta inflamatória uterina exacerbada momentânea que não teve impacto negativo no endométrio nem nos índices gestacionais. De forma semelhante, considerando os resultados obtidos duas semanas após o tratamento a alta concentração de ozono escolhida não foi prejudicial. Além disso, segundo Martínez-Sánchez (2020), a concentração disponível nos fluídos salinos corresponde a apenas 10% da concentração de ozono libertada pelo gerador.

O controle dos processos infecciosos, logo após o tratamento nas éguas A.T e B.T e após 15 dias nas éguas C.T e D.T corrobora com o fato do O₃ possuir propriedades antimicrobianas e imunomodulador quando administrado via tópica (Đuričić *et al.*, 2015, 2016); assim, a sua adição ao líquido de lavagem pode auxiliar no tratamento de processos infecciosos e diminuir o *stress* oxidativo de forma controlada e transitória (Almeida *et al.*, 2021). A literatura demonstrou que mesmo concentrações baixas de ozono possuem atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas spp* e *Candida albicans* (César *et al.*, 2012; Ling *et al.*, 2022). Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com Santos e colegas (2021) que referiram o uso de soluções salinas ozonizadas reduzindo a contagem microbiana, por exemplo, *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas spp.* e coliformes.

Após duas semanas do tratamento, d₁₈, todas as éguas evoluíram satisfatoriamente, apresentando redução significativa do quadro inflamatório, principalmente as éguas C.T e D.T, e com ausência de crescimento bacteriano. A lavagem uterina por si só é um método bastante eficaz na remoção mecânica de detritos, fluído acumulado, microorganismos e espermatozóides (Liu & Troedsson, 2008; Brinsko & Blanchard, 2011; Christoffersen & Troedsson, 2017), fato esse que justifica os achados observados nas avaliações citológica, microbiológica e macroscópica na presente pesquisa. A lavagem uterina com O₃ se mostrou vantajosa por supostamente melhorar a perfusão tecidual, a oxigenação e, conseqüentemente o ambiente uterino (Mali *et al.*, 2020), além

do controle microbiológico como discutido anteriormente. Em vacas com endometrite infecciosa, a insuflação uterina com O₃ foi mais eficaz na redução da população microbiana local em comparação com a cefalaxina (Mali *et al.*, 2020). Noutro estudo similar em vacas com infecções bacterianas, realizaram-se lavagens uterinas com solução salina ozonizada, demonstrando uma melhor resposta em comparação com gentamicina nos casos de *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* e *Arcanobacterium pyogenes*, sendo o antibiótico mais eficaz contra *Streptococcus pyogenes* (Durrani, 2017). Esses resultados confirmam a hipótese de que o uso de lavagens uterinas com solução ozonizada tem uma ação antimicrobiana eficaz, reduzindo a inflamação uterina, o que corrobora com os achados da presente pesquisa.

Analisando a Tabela 3, durante o tratamento com O₃ ocorreram alterações na cor e turbidez do líquido uterino a partir do segundo dia de tratamento, d₂. Com ajuda das Figuras 6, 7, 8 e 9, consegue-se observar que ocorreu uma melhoria considerável na cor e turbidez do líquido uterino da égua D.T. Para além disso, de modo geral houve um melhoramento das características macroscópicas, à exceção da égua C.T que obteve uma cor e turbidez mais notável no último dia de tratamento com O₃. Noutros estudos realizados em mulheres, Calderon e colaboradores (2016) sugeriram que o uso de lavagens uterinas com solução salina NaCl 0,9% ozonizada tiveram um efeito positivo na angiogénese endometrial. Curiosamente, no presente estudo, através da observação do líquido uterino recolhido ao longo do tratamento com ozono conseguiu-se observar alterações macroscópicas positivas do mesmo. Mais, a utilização de ozonoterapia em éguas também tem vindo a ser indicada para a melhoria da performance reprodutiva, tal como sugerido por Ferreira e colegas (2021), que executaram insuflações uterinas em éguas saudáveis com diferentes concentrações de O₃ medicinal, de forma similar ao que foi prescrito no grupo teste, observando que concentrações baixas de ozono promoviam a angiogénese local. No entanto, no presente estudo, considerando que os animais já apresentavam uma idade avançada, teria sido interessante a realização de biópsias do tecido endometrial antes e após a aplicação de ozonoterapia visando a observação de possíveis melhorias a nível uterino. Em todo o caso, ambos os autores afirmam que a ozonoterapia pode ter um papel importante na infertilidade como tratamento integrativo seguro, tal como observado no presente estudo.

5. Conclusão

Atualmente, a utilização da ozonoterapia em medicina veterinária, nomeadamente em reprodução equina tem vindo a demonstrar-se uma boa ferramenta terapêutica adjuvante.

O presente estudo demonstrou que a utilização de lavagem uterina com solução fisiológica NaCl 0,9% ozonizada apresentou, no presente grupo de animais, um efeito positivo na redução da inflamação, citologicamente, e no controle de agentes microbianos em éguas adultas. Esta terapia poderá ser usada de forma preventiva e/ou de rotina, e conseqüentemente, pode reduzir a utilização de antibióticos minimizando o desenvolvimento de quadros de resistência bacteriana, auxiliando assim na melhoria dos índices reprodutivos.

No entanto, a partir dos dados do presente trabalho, sugerem-se estudos que aprofundem os conhecimentos nesta área de forma a padronizar concentrações, tempo de administração e o uso correto e direcionado, visando benefícios para a equinicultura e bem-estar de éguas usadas na reprodução. Para além disso, para futuros estudos relacionados com esta temática, deve-se ter em conta ainda certas limitações do presente trabalho, nomeadamente número reduzido de animais abrangidos pelo mesmo, bem como a baixa diversidade da faixa etária entre estes animais.

6. Referências Bibliográficas

- Abbas, K.A.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. (2015). *Imunologia Celular e Molecular*. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Abdelnaby, E. A., Emam, I. A., Salem, N. Y., Ramadan, E. S., Khattab, M. S., Farghali, H. A., & Abd El Kader, N. A. (2020). Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mares with endometritis. *Theriogenology*, 158, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.012>
- Albihn, A., Båverud, V., & Magnusson, U. (2003). Uterine Microbiology and Antimicrobial Susceptibility in Isolated Bacteria from Mares with Fertility Problems. 44(3), 9.
- Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Carlson, C. S., & Troedsson, M. H. T. (2005). Nitric Oxide Levels and Nitric Oxide Synthase Expression in Uterine Samples from Mares Susceptible and Resistant to Persistent Breeding-induced Endometritis: Nitric oxide and endometritis in the mare. *American Journal of Reproductive Immunology*, 53(5), 230–237. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00270.x>
- Almeida, B. F. M. de, 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., Joaquim, J. G. F., & Rubio, C. P. (2021). Effect of uterine ozone therapy and anticoagulant sampling on oxidative stress parameters in mares. *Research in Veterinary Science*, 136, 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.002>
- Alves, G. E. S., Abreu, J. M. G., Ribeiro Filho, J. D., Muzzi, L. A. L., Oliveira, H. P., Tannus, R. J., & Buchanan, T. (2004). Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em eqüinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56(4), 433–437. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000400002>
- Aurich, J., & Aurich, C. (2006). Developments in European Horse Breeding and Consequences for Veterinarians in Equine Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(4), 275–279. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00719.x>

- Ávila, A. C. A., Diniz, N. C., Serpa, R. T., Chaves, M. M. B. de C., Viu, M. A. de O., & de Oliveira, R. A. (2022). Effectiveness of Ozone Therapy in The Treatment of Endometritis in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 112, 103900. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103900>
- Ball, B. A., Shin, S. J., Patten, V. H., Lein, D. H., & Woods, G. L. (1988). Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. 29(6), 15.
- Beltaire, K. A., Cheong, S. H., & Coutinho da Silva, M. A. (2012). Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999-2011): Fungal endometritis in mares. *Equine Veterinary Journal*, 44, 84–87. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00608.x>
- Bocci, V., & Di Paolo, N. (2009). Oxygen-Ozone Therapy in Medicine: An Update. *Blood Purification*, 28(4), 373–376. <https://doi.org/10.1159/000236365>
- Bocci, V. A. (2006). Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Archives of Medical Research*, 37(4), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>
- Bocci, V. (2002). Ozonotherapy in Veterinary Medicine. Em V. Bocci, *Oxygen-Ozone Therapy* (pp. 337–339). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9952-8_28
- Bocci, V. (1992). Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis. *Medical Hypotheses*, 39(1), 30–34. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(92\)90136-Z](https://doi.org/10.1016/0306-9877(92)90136-Z)
- Brendemuehl, J.P.; Kopp, K.; Altman, J. (2014). Influence of dietary algal N-3 fatty acids on breeding induced inflammation and endometrial cytokine expression in mares bred with frozen semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.34, p.123-124.
- Brinsko, S. P., & Blanchard, T. L. (Eds.). (2011). *Manual of equine reproduction* (3rd ed). Mosby/Elsevier.
- Brook, D. (1985). Cytological and bacteriological examination of the Mare's endometrium. *Journal of Equine Veterinary Science*, 5(1), 16–22. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(85\)80079-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(85)80079-4)
- Bucca, S., Carli, A., Buckley, T., Dolci, G., & Fogarty, U. (2008). The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*, 70(7), 1093–1100. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.029>

- Buczowska, J., Kozdrowski, R., Sikora, M., Dzieciol, M., & Matusz, A. (2015). Non-traditional treatments for endometritis in mares. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18(4), 285–293. <https://doi.org/10.15547/bjvm.870>
- Buczowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., Staroniewicz, Z., & Siemieniuch, M. J. (2014). Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-27>
- Burleson, M., LeBlanc, M., Riddle, W., & Hendricks, K. (2010). Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. *Animal Reproduction Science*, 121(1–2), 103. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.162>
- Calderon, I., Cohen, M., Sagi-Dain, L., Artzi, O., Bejar, J., & Sagi, S. (2016). The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium – A preliminary study. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 36(5), 635–640. <https://doi.org/10.3109/01443615.2015.1133579>
- Câmara, B. (2019). Imunologia Linfócitos T CD4: Th1 e Th2. *Biomedicina Padrão o blog da medicina*. Acedido em 4 de novembro de 2019 em <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/10/linfocitos-th1-e-th2.html>
- Canisso, I. F., Segabinazzi, L. G. T. M., & Fedorka, C. E. (2020). Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares—A Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1432. <https://doi.org/10.3390/ijms21041432>
- Canisso, I. F., Stewart, J., & Coutinho da Silva, M. A. (2016). Endometritis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 465–480. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.004>
- Card, C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, 64(3), 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.041>
- Causey, R. C. (2006). Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. *The Veterinary Journal*, 172(3), 405–421. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.08.005>

César, J., Sumita, T. C., Junqueira, J. C., Jorge, A. O. C., & do Rego, M. A. (2012). Antimicrobial effects of ozonated water on the sanitization of dental instruments contaminated with *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, or the spores of *B. atrophaeus*. *Journal of Infection and Public Health*, 5(4), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.12.007>

Christoffersen, M., & Troedsson, M. (2017). Inflammation and fertility in the mare. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 14–20. <https://doi.org/10.1111/rda.13013>

Christoffersen, M., Söderlind, M., Rudefalk, S. R., Pedersen, H. G., Allen, J., & Krekeler, N. (2015). Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by *Streptococcus zooepidemicus*. *Theriogenology*, 84(8), 1283–1290. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.007>

Clinic of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia, Samardžija, M., Turk, R., Sobiech, P., Valpotić, H., Harapin, I., Gračner, D., & Đuričić, D. (2017). Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: A review. *Veterinarski Arhiv*, 87(3). <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.160119a>

Cocchia, N., Paciello, O., Auletta, L., Uccello, V., Silvestro, L., Mallardo, K., Paraggio, G., & Pasolini, M. P. (2012). Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, 77(1), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.020>

Constantin, T., & Bîrtoiu, I. A. (2016). Preliminary Study on Ozone Therapy in Postpartum Endometritis of Dairy Cows. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 10, 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.09.078>

Dascanio, J. J., Schweizer, C., & Ley, W. B. (2010). Equine fungal endometritis. *Equine Veterinary Education*, 13(6), 324–329. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2001.tb00122.x>

de Souza, A. K. L., Colares, R. R., & de Souza, A. C. L. (2021). The main uses of ozone therapy in diseases of large animals: A review. *Research in Veterinary Science*, 136, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.01.018>

Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., Lopes, M. D., Alvarenga, M. A., Macedo, L. P., & Melo, C. M. (2006). Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine

frozen semen. *Animal Reproduction Science*, 94(1–4), 270–273.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.061>

Díaz-Bertrana, M. L., Deleuze, S., Pitti Rios, L., Yeste, M., Morales Fariña, I., & Rivera del Alamo, M. M. (2021). Microbial Prevalence and Antimicrobial Sensitivity in Equine Endometritis in Field Conditions. *Animals*, 11(5), 1476. <https://doi.org/10.3390/ani11051476>

Díaz-Soto, M. T., Fraga Pérez, A., Dranguet Vaillant, J., Mallok, A., Viebahn-Hänsler, R., Menéndez Cepero, S., & León Fernández, O. S. (2012). Ozone Therapy Ameliorates Nervous System Disorders and Oxidative Stress in Patients During Ethanol Withdrawal—A Pilot Study. *Ozone: Science & Engineering*, 34(6), 432–437. <https://doi.org/10.1080/01919512.2012.717858>

Diel de Amorim, M., Gartley, C. J., Foster, R. A., Hill, A., Scholtz, E. L., Hayes, A., & Chenier, T. S. (2016). 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*, 44, 54–61.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.10.012>

Đuričić, D., Valpotić, H., Žura Žaja, I., & Samardžija, M. (2016). Comparison of Intrauterine Antibiotics versus Ozone Medical Use in Sheep with Retained Placenta and Following Obstetric Assistance. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 538–540. <https://doi.org/10.1111/rda.12715>

Đuričić, D., Valpotić, H., & Samardžija, M. (2015). Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Animal Reproduction Science*, 159, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.017>

Djuricic, D., Valpotic, H., & Samardzija, M. (2015). The Intrauterine Treatment of the Retained Foetal Membrane in Dairy Goats by Ozone: Novel Alternative to Antibiotic Therapy. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 236–239. <https://doi.org/10.1111/rda.12475>

Djuricic, D., Vince, S., Ablondi, M., Dobranic, T., & Samardzija, M. (2012). Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. *Animal Reproduction Science*, 134(3–4), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.023>

Durrani, A. Z. (2017). An Alternative Therapy with Ozone to Avoid Antimicrobial Resistance (AMR) in Uterine Infections in Dairy Cattle. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1(3). <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2017.01.000303>

Esteller-Vico, A., Liu, I. K., & Couto, S. (2012). Uterine vascular degeneration is present throughout the uterine wall of multiparous mares. Colinearity between elastosis, endometrial grade, age, and parity. *Theriogenology*, 78(5), 1078–1084. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.014>

European Horse Network. (2021). European Horse Network. European Horse Network. Acedido em 16 de novembro de 2022 em <https://www.europeanhorsenetwork.eu/>

Evans, M. J., Hamer, J. M., Gason, L. M., Graham, C. S., Asbury, A. C., & Irvine, C. H. G. (1986). Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: Effect of steroid hormone environment. *Theriogenology*, 26(1), 37–50. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90110-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90110-X)

Factor, L., Cruz, D. S. G., & Orlandi, C. M. B. (2019). Métodos de coleta de amostra para exame de citologia endometrial em éguas com endometrite. 8. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-15349>

Ferreira, J. C., Amaral, R. S., & Cintra, B. de S. (2021). Ozonioterapia no tratamento auxiliar de éguas inférteis: Potencial angiogênico e antimicrobiano. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 45(4), 482–488. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.064>

Ferris, D. R. A. (2017). Therapeutics for Infectious Endometritis: A Clinical Perspective. 5. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-17298>

Ferris, R. A., McCue, P. M., Borlee, G. I., Loncar, K. D., Hennes, M. L., & Borlee, B. R. (2016). In Vitro Efficacy of Nonantibiotic Treatments on Biofilm Disruption of Gram-Negative Pathogens and an In Vivo Model of Infectious Endometritis Utilizing Isolates from the Equine Uterus. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 631–639. <https://doi.org/10.1128/JCM.02861-15>

Frontoso, R., De Carlo, E., Pasolini, M. P., van der Meulen, K., Pagnini, U., Iovane, G., & De Martino, L. (2008). Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities

in equine uteri during fertility problems. *Research in Veterinary Science*, 84(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.02.008>

Fumuso, E., Aguilar, J., Giguère, S., David, O., Wade, J., & Rogan, D. (2006). Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. *Animal Reproduction Science*, 94(1–4), 282–285. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.006>

Fumuso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I., & Bowden, R. A. (2003). Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96(1–2), 31–41. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00137-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00137-5)

Gallego Rodríguez, R. S., Ruiz Jaramillo, A. F., & Ruiz Buitrago, J. D. (2020). Frecuencia del aislamiento bacteriano y patrones de sensibilidad en yeguas criollas colombianas diagnosticadas con endometritis. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(41), 13–21. <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss41.2>

Giuliani, G., Ricevuti, G., Galoforo, A., & Franzini, M. (2018). Microbiological aspects of ozone: Bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone. *Ozone Therapy*, 3(3). <https://doi.org/10.4081/ozone.2018.7971>

Gomes, G. M., Crespilho, A. M., Leão, K. M., Jacob, J. C. F., Gomes, L. P. M., Segabinazzi, L. G., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2019). Can Sperm Selection, Inseminating Dose, and Artificial Insemination Technique Influence Endometrial Inflammatory Response in Mares? *Journal of Equine Veterinary Science*, 73, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.09.010>

González, C., Moreno, L., Fumuso, E., García, J., Rivulgo, M., Confalonieri, A., Sparo, M., & Sánchez Bruni, S. (2009). Enrofloxacin-based therapeutic strategy for the prevention of endometritis in susceptible mares: Enrofloxacin-based therapeutic strategy for endometritis in mares. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33(3), 287–294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01135.x>

H A Morris, L., M McCue, P., & Aurich, C. (2020). Equine endometritis: A review of challenges and new approaches. *Reproduction*, 160(5), R95–R110. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0478>

Han, H.-J., Kim, J.-Y., Jang, H.-Y., Lee, B., Yoon, J.-H., Jang, S.-K., Choi, S. H., & Jeong, S.-W. (2007). Fluoroscopic-guided Intradiscal Oxygen-Ozone Injection Therapy for Thoracolumbar Intervertebral Disc Herniations in Dogs. *In Vivo*.

Hayashi, M. P., & Friolani, M. (2018). Aplicabilidade clínica cirúrgica da ozonoterapia em pequenos animais: Revisão de literatura. 27, 13, 88-100. <http://ojs.unimar.br/index.php/ciencias/article/view/681>

Hemberg, E., Lundeheim, N., & Einarsson, S. (2005). Retrospective Study on Vulvar Conformation in Relation to Endometrial Cytology and Fertility in Thoroughbred Mares. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 52(9), 474–477. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00760.x>

Henneke, D. R., Potter, G. D., Kreider, J. L., & Yeates, B. F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements, and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371–372. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>

Hinrichs, K., Spensley, M. S., & McDONOUGH, P. L. (1992). Evaluation of progesterone treatment to create a model for equine endometritis. *Equine Veterinary Journal*, 24(6), 457–461. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1992.tb02876.x>

Hughes, J.P., Loy, R.G. (1969). Investigations on the effect of intrauterine inoculations of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. *Proceedings Am Assoc Equine Pract*, v.15, p.289-292.

Hurtgen, J. P. (2006). Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology*, 66(3), 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.006>

Imhof, S., Luternauer, M., Hüsler, J., Steiner, A., & Hirsbrunner, G. (2019). Therapy of retained fetal membranes in cattle: Comparison of two treatment protocols. *Animal Reproduction Science*, 206, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.04.013>

Inoue, Y., & Sekiguchi, M. (2017). Vestibuloplasty for Persistent Pneumovagina in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 48, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.008>

- Katila, T., & Ferreira-Dias, G. (2022). Evolution of the Concepts of Endometriosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals*, 12(6), 779. <https://doi.org/10.3390/ani12060779>
- Katila, T. (1996). Uterine defence mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*, 42(1–4), 197–204. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01507-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01507-2)
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Khan, F. A., Scholtz, E. L., & Chenier, T. S. (2015). The Nitric Oxide System in Equine Reproduction: Current Status and Future Directions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(6), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.02.009>
- Kidd, J., Lu, K. G., & Frazer, M. L. (Eds.). (2014). *Atlas of equine ultrasonography*. John Wiley & Sons, Inc.
- Knutti, B., Pycocock, J. F., Weijden, G. C., & Küpfer, U. (2010). The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. *Equine Veterinary Education*, 12(5), 267–270. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2000.tb00056.x>
- Köhne, M., Kuhlmann, M., Tönißen, A., Martinsson, G., & Sieme, H. (2020). Diagnostic and Treatment Practices of Equine Endometritis—A Questionnaire. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 547. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00547>
- König, H. E., & Liebich, H.-G. (2016). *Anatomia dos Animais Domésticos—Texto e Atlas Colorido*. Em *Anatomia dos animais domésticos: Texto e atlas colorido* (6a Edição, p. 824). Artmed.
- Kozdrowski, R., Sikora, M., Buczkowska, J., Nowak, M., Raś, A., & Dziecioł, M. (2015). Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. *Animal Reproduction Science*, 154, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.009>

- Krimer, P. M., & Miller, D. M. (2020). Uterine Cytology. Em L. C. Sharkey, M. J. Radin, & D. Seelig (Eds.), *Veterinary Cytology* (1.a ed., pp. 559–581). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119380559.ch43>
- Lanci, A., Perina, F., Donadoni, A., Castagnetti, C., & Mariella, J. (2022). Dystocia in the Standardbred Mare: A Retrospective Study from 2004 to 2020. *Animals*, 12(12), 1486. <https://doi.org/10.3390/ani12121486>
- LeBlanc, M. (2010). Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare: Diagnostics and Treatments for Equine Endometritis. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 21–27. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x>
- LeBlanc, M., & Causey, R. (2009). Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 10–22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x>
- LeBlanc, M. M. (2008). When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology*, 70(3), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.021>
- LeBlanc, M. M., Magsig, J., & Stromberg, A. J. (2007). Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, 68(3), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.038>
- LeBlanc, M. M., Johnson, R. D., Calderwood Mays, M. B., & Valderrama, C. (1995). Lymphatic Clearance of India Ink in Reproductively Normal Mares and Mares Susceptible to Endometritis 1. *Biology of Reproduction*, 52 (1), 501–506. https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.501
- Ling, Y., Tan, H., Shen, L., Wei, L., Xiong, G., Wang, L., Wu, W., & Qiao, Y. (2022). Microbial Evaluation of Ozone Water Combined with Ultrasound Cleaning on Crayfish (*Procambarus clarkii*). *Foods*, 11(15), 2314. <https://doi.org/10.3390/foods11152314>
- Liu, I. K. M., & Troedsson, M. H. T. (2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology*, 70(3), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.040>

- Machado, V. S., Oikonomou, G., Ganda, E. K., Stephens, L., Milhomem, M., Freitas, G. L., Zinicola, M., Pearson, J., Wieland, M., Guard, C., Gilbert, R. O., & Bicalho, R. C. (2015). The effect of intrauterine infusion of dextrose on clinical endometritis cure rate and reproductive performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3849–3858. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9046>
- Mah, T.-F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
- Malaluang, P., Wilén, E., Lindahl, J., Hansson, I., & Morrell, J. M. (2021). Antimicrobial Resistance in Equine Reproduction. *Animals*, 11(11), 3035. <https://doi.org/10.3390/ani11113035>
- Mali, S. S., Rangnekar, M. N., Amle, M. B., Khillare, K. P., Mali, A. B., & Mhase, P. P. (2020). Efficacy of intrauterine ozone therapy in repeat breeder cows with subclinical uterine infection. 4. College of Veterinary Sciences, Lala Lajpat Rai University of Veterinary and Animal Sciences, 2020. 83-86 p. v. 59. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20203167591>
- Maloufi, F., Pierson, R., Otto, S., Ball, C., & Card, C. (2002). Mares Susceptible or Resistant to Endometritis Have Similar Endometrial Echographic and Inflammatory Cell Reactions at 96 Hours After Infusion with Frozen Semen and Extender.
- Marth, C. D., Firestone, S. M., Glenton, L. Y., Browning, G. F., Young, N. D., & Krekeler, N. (2016). Oestrous cycle-dependent equine uterine immune response to induced infectious endometritis. *Veterinary Research*, 47(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0398-x>
- Martínez-Sánchez, G. (2020). Practical aspects in ozone therapy: Study of the ozone concentration in the ozonized saline solution. 10.
- Martínez-Sánchez, G., Al-Dalain, S. M., Menéndez, S., Re, L., Giuliani, A., Candelario-Jalil, E., Álvarez, H., Fernández-Montequín, J. I., & León, O. S. (2005). Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology*, 523(1–3), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.08.020>
- Mazzuchini, M. P., Okada, C. T. C., Joaquim, J. G. F., & Alvarenga, M. A. (2022). (Segurança da lavagem uterina com solução salina ozonizada em éguas). *Archives of Veterinary Science*, 17.

- Menéndez, S., Cepero, J., & Borrego, L. (2008). Ozone Therapy in Cancer Treatment: State of the Art. *Ozone: Science & Engineering*, 30(6), 398–404. <https://doi.org/10.1080/01919510802473724>
- Montechiesi, D.F.; Ignácio, F.S. (2018). Ozonioterapia local para tratamento de infecção uterina em éguas. *ARS Veterinária*, v.34, n.4, suplemento, p.147.
- Nascente, E. de P., Chagas, S. R., Pessoa, A. V. C., Matos, M. P. C., Andrade, M. A., & Pascoal, L. M. (2019). Potencial antimicrobiano do ozônio: Aplicações e perspectivas em medicina veterinária. *Pubvet*, 13(9), 1–14. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n9a412.1-14>
- Nielsen, J. M. (2005). Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*, 64(3), 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.034>
- Oliver, S. P., Pighetti, G. M., & Almeida, R. A. (2011). Mastitis Pathogens | Environmental Pathogens. Em *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 415–421). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00301-0>
- Overbeck, W., Witte, T. S., & Heuwieser, W. (2011). Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, 75(7), 1311–1318. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.002>
- Ozbay, I., Ital, I., Kucur, C., Akcılar, R., Deger, A., Aktas, S., & Oghan, F. (2017). Effects of ozone therapy on facial nerve regeneration. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 83(2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.02.009>
- Palm, F., Walter, I., Budik, S., Kolodziejek, J., Nowotny, N., & Aurich, C. (2008). Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology*, 70(5), 843–851. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.054>
- Paolucci, T., Agostini, F., Bernetti, A., Paoloni, M., Mangone, M., Santilli, V., Pezzi, L., Bellomo, R. G., & Saggini, R. (2021). Integration of focal vibration and intra-articular oxygen–ozone therapy in rehabilitation of painful knee osteoarthritis. *Journal of International Medical Research*, 49(2), 030006052098670. <https://doi.org/10.1177/0300060520986705>

- Pasolini, M. P., Del Prete, C., Fabbri, S., & Auletta, L. (2016). Endometritis and Infertility in the Mare – The Challenge in Equine Breeding Industry—A Review. Em A. M. Darwish (Ed.), *Genital Infections and Infertility*. InTech. <https://doi.org/10.5772/62461>
- Petersen, M. R., Skive, B., Christoffersen, M., Lu, K., Nielsen, J. M., Troedsson, M. H. T., & Bojesen, A. M. (2015). Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies *zoepidemicus* in mares with subclinical endometritis. *Veterinary Microbiology*, 179(1–2), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.006>
- Plummer, P. J., & Plummer, C. (2012). Diseases of the Mammary Gland. Em *Sheep and Goat Medicine* (pp. 442–465). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2353-3.10015-0>
- Polat, B., CengiZ, M., Çolak, A., & CannaziK, O. (2015). Subklinik Endometritisli İneklerde İntrauterin Ozon ve Rifaksimin Tedavisinin Karşılaştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2015.13690>
- Pycock, J. F., & Allen, W. E. (1990). Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Veterinary Journal*, 22(6), 422–425. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1990.tb04309.x>
- Rangel, K., Cabral, F. O., Lechuga, G. C., Carvalho, J. P. R. S., Villas-Bôas, M. H. S., Midlej, V., & De-Simone, S. G. (2022). Potent Activity of a High Concentration of Chemical Ozone against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Molecules*, 27(13), 3998. <https://doi.org/10.3390/molecules27133998>
- Rasmussen, C. D., Petersen, M. R., Bojesen, A. M., Pedersen, H. G., Lehn-Jensen, H., & Christoffersen, M. (2015). Equine Infectious Endometritis—Clinical and Subclinical Cases. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(2), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.12.002>
- Ravaioli, V., Raffini, E., Tamburini, M., Galletti, G., & Frasnelli, M. (2022). Infectious Endometritis in Mares: Microbiological Findings in Field Samples. *Journal of Equine Veterinary Science*, 112, 103913. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103913>
- Re, L., Martínez-Sánchez, G., Bordicchia, M., Malcangi, G., Pocognoli, A., Angel Morales-Segura, M., Rothchild, J., & Rojas, A. (2014). Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE

activation pathway in vivo? A preliminary result. *European Journal of Pharmacology*, 742, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.029>

Reed, S. M., Bayly, W. M., & Sellon, D. C. (Eds.). (2018). *Equine internal medicine* (Fourth edition). Elsevier.

Reilas, T., Rivera del Alamo, M. M., Liepina, E., Yeste, M., & Katila, T. (2016). Effects on the equine endometrium of cervical occlusion after insemination. *Theriogenology*, 85(4), 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.053>

Repciuc, C. C., Crecan, C. M., & Oană, L. I. (2016). OZONE THERAPY IN VETERINARY MEDICINE. 6.

Riddle, W. T., LeBlanc, M. M., & Stromberg, A. J. (2007). Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, 68(3), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.050>

Rua, M. A. S., Quirino, C. R., Ribeiro, R. B., Carvalho, E. C. Q., Bernadino, M. de L. A., Bartholazzi Junior, A., Cipagalta, L. F., & Barreto, M. A. P. (2018). Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares. *Theriogenology*, 114, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.03.042>

Sagai, M., & Bocci, V. (2011). Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Medical Gas Research*, 1(1), 29. <https://doi.org/10.1186/2045-9912-1-29>

Samardžija M, Turk R, Sobiech P, Valpotić H, Harapin I, Gračner D, Đuričić D. 2017. Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: a review. *Veterinarski arhiv*, 87(3), 363–375.

Santos, L. M. C. dos, Silva, E. S. da, Oliveira, F. O., Rodrigues, L. de A. P., Neves, P. R. F., Meira, C. S., Moreira, G. A. F., Lobato, G. M., Nascimento, C., Gerhardt, M., Lessa, A. S., Mascarenhas, L. A. B., & Machado, B. A. S. (2021). Ozonized Water in Microbial Control: Analysis of the Stability, In Vitro Biocidal Potential, and Cytotoxicity. *Biology*, 10(6), 525. <https://doi.org/10.3390/biology10060525>

- Satué, K., & Gardon, J. C. (2016). Infection and Infertility in Mares. Em A. M. Darwish (Ed.), *Genital Infections and Infertility*. InTech. <https://doi.org/10.5772/63741>
- Sciorsci, R. L., Lillo, E., Occhiogrosso, L., & Rizzo, A. (2020). Ozone therapy in veterinary medicine: A review. *Research in Veterinary Science*, 130, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.03.026>
- Scoggin, C. F. (2016). Endometritis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.002>
- Scoggin, C. F. (2015). Not just a number: Effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in thoroughbred broodmares. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(6), 872. <https://doi.org/10.1071/RD14390>
- Sconza, C., Leonardi, G., Kon, E., Respizzi, S., Massazza, G., Marcacci, M., & Matteo, B. D. (2021). Oxygen-ozone therapy for the treatment of low back pain: A systematic review of randomized controlled trials. 13.
- Scrollavezza, P., Ansaloni, F., Polidori, P., Ablondi, M., & Pogliacani, B. (2002). Ozonized autohemotherapy, a new method to treat dairy cow acute interdigital phlegmon. Comparison with ceftiofur and oxytetracycline. *Italian Journal of Animal Science*, 1(3), 211–216. <https://doi.org/10.4081/ijas.2002.211>
- Scwhartz, A., & Martínez-Sánchez, G. (2012). La Ozonoterapia y su fundamentación científica. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol. 2, nº1, pp. 163-198.
- Segabinazzi, L. G., Friso, A. M., Correal, S. B., Crespilho, A. M., Dell’Aqua, J. A., Miró, J., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2017). Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology*, 104, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.007>
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A. B., Kaldalu, N., Kurg, K., & Lewis, K. (2006). Persisters: A distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiology*, 6(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-53>

- Sharkhuu, T., Doerfler, D. L., Copeland, C., Luebke, R. W., & Gilmour, M. I. (2011). Effect of maternal exposure to ozone on reproductive outcome and immune, inflammatory, and allergic responses in the offspring. *Journal of Immunotoxicology*, 8(2), 183–194. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2011.568978>
- Skive, B., Rohde, M., Molinari, G., Braunstein, T. H., & Bojesen, A. M. (2017). *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* Invades and Survives in Epithelial Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 465. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00465>
- Squires, E. L. (2019). Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1753. <https://doi.org/10.1071/RD19365>
- Stoker, M. G. (1916). The surgical uses of ozone by George Stoker, M.R.C.P. IREL., M.R.C.S. ENG., 1. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)31717-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)31717-8)
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Stout, T. A. E. (2008). Fungal endometritis in the mare: *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 24(1), 83–87. <https://doi.org/10.21836/PEM20080117>
- Szenci, O. (2016). Recent Possibilities for Diagnosis and Treatment of Post Parturient Uterine Diseases in Dairy Cow. *Journal of Fertilization: In Vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology*, 04(01). <https://doi.org/10.4172/2375-4508.1000170>
- Teixeira, L. R., Luna, S. P. L., Taffarel, M. O., Lima, A. F. M., Sousa, N. R., Joaquim, J. G. F., & Freitas, P. M. C. (2013). Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. *The Veterinary Journal*, 197(3), 794–799. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.015>
- Thomson, P., Pareja, J., ez, A., ez, R., & Castro, R. (2022). Characterization of microbial communities and predicted metabolic pathways in the uterus of healthy mares. *Open Veterinary Journal*, 12(6), 797. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2022.v12.i6.3>

- Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., Engebretsen, I. L., Bayles, K. W., Horswill, A. R., & Kielian, T. (2011). Staphylococcus aureus Biofilms Prevent Macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6585–6596. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002794>
- Tibary, A., & Ruiz, A. (2018). Trastornos uterinos en la yegua: Diagnóstico, tratamiento y prevención. *SPERMOVA*, 8(1), 1–24. <https://doi.org/10.18548/aspe/0006.01>
- Troedsson, M. H. T. (2006). Breeding-Induced Endometritis in Mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 22(3), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.07.003>
- Troedsson, M. H. T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the. 11. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00143-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00143-0)
- Troedsson, M.H.T. (1997). Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. *Pferdeheikunde*, v.13, p.516-520.
- Troedsson, M. H. T., Liu, I. K. M., Ing, M., Pascoe, J., & Thurmond, M. (1993). Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Reproduction*, 99(2), 307–313. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990307>
- Trotter, G. W., & McKinnon, A. O. (1988). Surgery for Abnormal Vulvar and Perineal Conformation in the Mare. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 4(3), 389–405. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30618-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30618-1)
- Viebahn-Hänsler, R., León Fernández, O. S., & Fahmy, Z. (2016). Ozone in Medicine: Clinical Evaluation and Evidence Classification of the Systemic Ozone Applications, Major Autohemotherapy and Rectal Insufflation, According to the Requirements for Evidence-Based Medicine. *Ozone: Science & Engineering*, 38(5), 322–345. <https://doi.org/10.1080/01919512.2016.1191992>
- Vigliani, A., Boniperti, E., & Scudo, E. (2005). Paravertebral O2-O3 Treatment in Mechanical Lumbar Pain in Riding Horses.

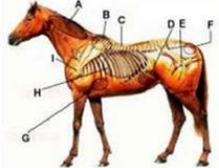
- Walter, J., Neuberg, K. P., Failing, K., & Wehrend, A. (2012). Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Animal Reproduction Science*, 132(3–4), 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.012>
- Wojtysiak, K., Ryszka, W., Stefaniak, T., Król, J., & Kozdrowski, R. (2020). Changes in the Secretion of Anti-Inflammatory Cytokines and Acute-Phase Proteins in the Uterus after Artificial Insemination in the Mare. *Animals*, 10(12), 2438. <https://doi.org/10.3390/ani10122438>
- Woodward, E., Christoffersen, M., Campos, J., Horohov, D., Scoggin, K., Squires, E., & Troedsson, M. (2013). An Investigation of Uterine Nitric Oxide Production in Mares Susceptible and Resistant to Persistent Breeding-Induced Endometritis and the Effects of Immunomodulation. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(4), 554–561. <https://doi.org/10.1111/rda.12124>
- Woodward, E. M., & Troedsson, M. H. (2013). Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(9), 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.11.010>
- Zobel, R., Martinec, R., Ivanovi, D., Stan, Z., & Smolec, O. (2014). Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle. *Vet. Arhiv*, 8.
- Zobel, R., & Tkalčić, S. (2013). Efficacy of Ozone and Other Treatment Modalities for Retained Placenta in Dairy Cows: Ozone and Other Treatments for Retained Placenta. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(1), 121–125. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02041.x>
- Zobel, R., Tkalčić, S., Štoković, I., Pipal, I., & Buić, V. (2012). Efficacy of Ozone as a Novel Treatment Option for Urovagina in Dairy Cows: Ozone Treatment for Urovagina in Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 293–298. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01857.x>

Anexos

Anexo I – Gráfico de pontuação de condição corporal.



BODY CONDITION SCORING CHART



Areas of Emphasis for Body Condition Scoring

- A: Thickening of the neck
- B: Fat covering the withers
- C: Fat deposits along backbone
- D: Fat deposit on flanks
- E: Fat deposits on inner thigh
- F: Fat deposits around tailhead
- G: Fat deposit behind shoulder
- H: Fat covering ribs
- I: Shoulder blends into neck

1 Poor
Animal extremely emaciated; spinous processes, ribs, tailhead, tuber coxae, and tuber ischii projecting prominently; bone structure of withers, shoulders, and neck easily noticeable; no fatty tissue can be felt.

2 Very Thin
Animal emaciated; slight fat covering over base of spinous processes; transverse processes of lumbar vertebrae feel rounded; spinous processes, ribs, tailhead, tuber coxae, and tuber ischii prominent; withers, shoulders, and neck structure faintly discernable.

3 Thin
Fat buildup about halfway on spinous processes; transverse processes cannot be felt; slight fat cover over ribs; spinous processes and ribs easily discernable; tailhead prominent, but individual vertebrae cannot be identified visually; tuber coxae appear rounded but easily discernable; tuber ischii not distinguishable; withers, shoulders, and neck accentuated.

4 Moderately Thin
Slight ridge along back; faint outline of ribs discernable; tailhead prominence depends on conformation, fat can be felt around it; tuber coxae not discernable; withers, shoulders, and neck not obviously thin.

5 Moderate
Back is flat (no crease or ridge); ribs not visually distinguishable but easily felt; fat around tailhead beginning to feel spongy; withers appear rounded over spinous processes; shoulders and neck blend smoothly into body.

6 Moderately Fleshy
May have slight crease down back; fat over ribs fleshy/spongy; fat around tailhead soft; fat beginning to be deposited along sides of withers, behind shoulders, and along sides of neck.

7 Fleshy
May have crease down back; individual ribs can be felt, but noticeable filling between ribs with fat; fat around tailhead soft; fat deposited along withers, behind shoulders, and along neck.

8 Fat
Crease down back; difficult to feel ribs; fat around tailhead very soft; area along withers filled with fat; area behind shoulder filled with fat; noticeable thickening of neck; fat deposited along inner thighs.

9 Extremely Fat
Obvious crease down back; patchy fat appearing.

Henneke et al., 1983



Illustrations by Japan Racing Association

(Adaptado de Henneke *et al.*, 1983)