

RACHEL DE ANDRADE TAVARES

**EFEITOS DA INSUFLAÇÃO UTERINA COM A MISTURA GASOSA OXIGÊNIO-
OZÔNIO SOBRE O ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Bruna Waddington de Freitas

Coorientador: Jair Camargo Ferreira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T231e
2022
Tavares, Rachel de Andrade, 1994-
Efeitos da insuflação uterina com a mistura gasosa
oxigênio-ozônio sobre o endométrio de éguas / Rachel de
Andrade Tavares. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (79 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Bruna Waddington de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2022.

Referências bibliográficas: f. 68-74.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.496>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Éguas - Doenças - Tratamento. 2. Éguas - Reprodução.
3. Endometrite. 4. Ozonioterapia. I. Freitas, Bruna Waddington
de, 1982-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.10896


RACHEL DE ANDRADE TAVARES

**EFEITOS DA INSUFLAÇÃO UTERINA COM A MISTURA GASOSA OXIGÊNIO-
OZÔNIO SOBRE O ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de agosto de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **RACHEL DE ANDRADE TAVARES**
Data: 19/09/2023 15:30:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rachel de Andrade Tavares
Autora

Documento assinado digitalmente
 **BRUNA WADDINGTON DE FREITAS**
Data: 19/09/2023 20:47:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bruna Waddington de Freitas
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida família por sempre estar presente e por ser a minha base... mãe, pai, tia Ângela, Bay, Pedro, Lucas, Luigi e Sara, sem vocês não seria capaz de realizar tudo que sonhei.

Sou muito feliz também pelas amizades que se fizeram presentes nesses últimos dois anos, que mesmo de longe, foram capazes de me incentivar e dar forças para continuar. Érica, Tuti, Talitinha, Elaine, Thayne, Karine, Iara, Brendinha, Isa, Dudinha, Victoria, Ray, Natália, Paula, Surama, Bruna e Diana.

Aos meus estagiários que me ajudaram nos mais diversos problemas que apareceram durante o experimento assim como durante as aulas, Rayssa, Stéfany, Wericks, Giulia e Gabriel.

Aos professores e pós-graduandos que me auxiliaram em todas as minhas dúvidas e dificuldades durante esses últimos dois anos. Haroldo Vargas, Renner, Mariana Neves, Carlos Pereira, Maria Aparecida Scatamburlo e Jair Camargo.

A Prof. Bruna Waddington, por aceitar esse desafio, pela paciência, confiança e ensinamentos.

Aos haras Bavária, Capim Santo e Setor de Equideocultura UFV – Florestal, seus veterinários e funcionários. Rafael Goretti, André, Edinho, Edimar e Nicota

A UFV, Departamento de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação por sempre estarem de portas abertas e terem sido a minha casa durante esses últimos 9 anos. E todos os funcionários que me auxiliaram nesse período.

A banca por ter aceitado o convite e pela contribuição ao trabalho.

A Sociedade de Investigações Florestais - SIF e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”. (Nelson Mandela).

RESUMO

TAVARES, Rachel de Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Efeitos da insuflação uterina com a mistura gasosa oxigênio-ozônio sobre o endométrio de éguas.** Orientadora: Bruna Waddington de Freitas. Coorientador: Jair Camargo Ferreira.

A realização deste trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da insuflação uterina com mistura gasosa oxigênio-ozônio sobre o endométrio de éguas saudáveis e diagnosticadas com endometrite. No experimento 1 (EXP1), foram utilizadas 13 éguas em anestro estacional que receberam 10 mL de benzoato de estradiol (BE) e no experimento 2 (EXP2), 19 éguas cíclicas. Os animais foram avaliados por meio de palpação e ultrassonografia transretais e foram coletadas amostras para citologia, histopatologia e histomorfometria uterinas. Para a definição dos grupos experimentais, foi realizado lavado de baixo volume (LBV) para a avaliação da citologia uterina, que juntamente ao histórico reprodutivo e exame ginecológico, foram empregados para o diagnóstico da endometrite. No EXP1, os animais foram alocados em grupo controle (GC; n = 3) e grupo tratado (GT; n = 10). O dia da aplicação do BE foi considerado o D0 e as coletas das amostras começaram no D3, com o LBV seguido da biópsia uterina (B1). Os animais do EXP2 foram inicialmente classificados em éguas com e sem endometrite, e então, separados em controle negativo (receberam oxigênio) e controle positivo (receberam mistura gasosa oxigênio-ozônio). Dessa maneira, formaram-se 4 grupos experimentais: éguas sem endometrite controle negativo (GC-; n = 3) e tratada (GC+; n = 3), e por fim, éguas com endometrite controle negativo (GEC; n = 6) e tratada (GEBT; n = 7). Foram acompanhados dois ciclos estrais de cada animal e, ao detectar um folículo com tamanho igual ou superior a 30 mm associado a edema uterino grau 3, foi realizado o primeiro LBV seguido da aplicação 1 mL de Strelin®. A B1 foi coletada 5 dias após a detecção da ovulação (D5) e, em seguida, foi administrado 1 mL de Lutalyse® para o retorno ao estro. As insuflações uterinas foram iniciadas dois dias após a B1 em ambos os experimentos e foram sempre precedidas de um LBV, totalizando três aplicações com intervalo de 48h entre elas. A concentração empregada foi a de 44 µg/mL nos grupos tratados e 0 µg/mL nos grupos controles. A insuflação foi realizada, via cérvix, até se obter a distensão completa do útero. O último LBV foi coletado dois dias após a última insuflação. No EXP1, a segunda biópsia (B2) foi coletada logo após o último LBV e no EXP2, no D5 do ciclo seguinte após o fim das insuflações. Foram avaliados os parâmetros histopatológicos: 1. Alterações glandulares; 2. Edema; 3. Hemorragia; 4.

Infiltrado inflamatório; 5. Necrose. Na histomorfometria, foi avaliada a densidade volumétrica glandular, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e lúmen glandular, e por fim, mensurado o diâmetro glandular, altura do epitélio glandular e luminal. Após o tratamento, no EXP2, foi observada redução ($p < 0,05$) da contagem de polimorfonucleados/campo (PMN) ao comparar grupos, tratamentos e tempos. A avaliação histopatológica do infiltrado neutrofílico e linfocitário endometrial nos dois experimentos demonstraram que não ocorreu redução na frequência de células inflamatórias em nenhum dos nos grupos experimentais ($p > 0,05$). Por fim, não foi encontrada diferença nos parâmetros morfométricos avaliados ($p > 0,05$). Conclui-se que a insuflação uterina com mistura gasosa oxigênio-ozônio na concentração de 44 $\mu\text{g/mL}$ em éguas foi segura e que apresentou benefícios teciduais para éguas diagnosticadas com endometrite.

Palavras-chave: Ozonioterapia. Medicina alternativa. Reprodução equina. Subfertilidade. Inflamação uterina.

ABSTRACT

TAVARES, Rachel de Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **Effects of uterine insufflation with the oxygen-ozone gas mixture on the endometrium of mares.** Advisor: Bruna Waddington de Freitas. Co-advisor: Jair Camargo Ferreira.

The aim of this work was to evaluate the effect of uterine insufflation with oxygen-ozone gas mixture on the endometrium of healthy mares diagnosed with endometritis. In experiment 1 (EXP1), 13 mares in seasonal anestrus that received 10 mL of estradiol benzoate (EB) were used, and in experiment 2 (EXP2), 19 cyclic mares were used. The animals were evaluated by transrectal palpation and ultrasonography and samples were collected for uterine cytology, histopathology and histomorphometry. To define the experimental groups, a low-volume lavage (LVB) was performed to evaluate uterine cytology, which, together with the reproductive history and gynecological examination, were used to diagnose endometritis and define the experimental groups. In EXP1, the animals were divided into a control group (GC; n = 3) and a treated group (TG; n = 10). The day of EB application was considered D0, and sample collection began on D3, with LVB followed by uterine biopsy (B1). The animals from EXP2 were initially divided into mares with and without endometritis, and then separated into negative control (received oxygen) and positive control (received oxygen-ozone gas mixture). Thus, 4 experimental groups were formed: mares without endometritis, negative control (GC-; n = 3) and treated (GC+; n = 3), and finally, mares with endometritis, negative control (GEC; n = 6) and treated (GEBT; n = 7). Two cycles of each animal were followed and, when detecting a follicle with a size equal to or greater than 30 mm together with uterine edema 3, the first LVB was collected and 1 mL of Strelin® was applied. The first biopsy (B1) was collected 5 days after the ovulation (D5) and then 1 mL of Lutalyse® was applied to return to estrus. Uterine insufflations began two days after B1 in both experiments and were always preceded by an LVB, totaling 3 applications with an interval of 48 hours between them. The concentration used was 44µg/mL in the treated group and 0 µg/mL in the control group, and insufflation was performed until detection, via the cervix, of complete distension of the uterus. The last LVB was collected 2 days after the last insufflation. In EXP1, the second biopsy (B2) was collected right after the last LVB and in EXP2, on D5 of the following cycle after the end of insufflations. The histopathological parameters were evaluated: 1. Glandular changes; 2. Edema; 3. Bleeding; 4. Inflammatory infiltrate; 5. Necrosis. In the histomorphometry, the

glandular volumetric density, connective tissue, blood vessels and glandular lumen were evaluated, and glandular diameter, height of the glandular and luminal epithelium were measured. The histopathological evaluation of the endometrial neutrophilic and lymphocytic infiltrate in both experiments demonstrated that there was no reduction in the frequency of inflammatory cells in any of the experimental groups ($p>0.05$). Finally, no difference was found in morphometric parameters ($p>0.05$). It was concluded that the intrauterine insufflation with oxygen-ozone gas mixture at a concentration of 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in mares was safe and that there are benefits for the endometrium of mares diagnosed with endometritis.

Keywords: Ozone therapy. Integrative medicine. Equine reproduction. Subfertility. Uterine inflammation.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1.	Endometrite	13
2.1.1.	Agentes Etiológicos	14
2.1.1.1.	Bactérias	15
2.1.1.2.	Fungos	15
2.2.	Fisiopatogenia da endometrite	16
2.2.1.	Mecanismos de defesa uterinos	17
2.2.1.1.	Barreiras Físicas do trato urogenital	17
2.2.1.2.	Mecanismos imunológicos	18
2.2.1.3.	Contratilidade miometrial	19
2.2.1.4.	Outros fatores	19
2.3.	Diagnóstico	20
2.3.1.	Histórico	20
2.3.2.	Exame físico	20
2.3.2.1.	Escore de condição corporal	20
2.3.2.2.	Avaliação do períneo	21
2.3.2.3.	Vaginoscopia e palpação digital da cérvix	21
2.3.2.4.	Palpação transretal	22
2.3.2.5.	Ultrassonografia transretal	23
2.3.3.	Métodos laboratoriais de diagnóstico	23
2.3.3.1.	Coleta de amostras	23
2.3.3.2.	Processamento e avaliação	26
2.3.3.2.1.	Citologia endometrial	26
2.3.3.2.2.	Cultura microbiológica uterina	28
2.3.3.2.3.	Histologia endometrial	30
2.3.3.2.4.	Histomorfometria	32
2.4.	Tratamento	33
2.4.1.	Antibacterianos e antifúngicos	33
2.4.2.	Drogas ecbólicas	35
2.4.3.	Lavados uterinos	36

2.4.4.	Anti-inflamatórios	36
2.4.5.	Tratamentos e substâncias alternativas	37
2.5.	Ozonioterapia	38
2.5.1.	Bioquímica do ozônio	38
2.5.2.	Formas de aplicação	39
2.5.3.	Testes <i>in vitro</i>	39
2.5.4.	Medicina humana	40
2.5.5.	Medicina veterinária	40
3.	OBJETIVOS	41
3.1.	Objetivo geral	41
3.2.	Objetivos específicos	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1.	Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV	41
4.2.	Delineamento experimental	41
4.2.1.	Experimento 1	41
4.2.1.1.	Local e período experimental	41
4.2.1.2.	Animais	42
4.2.1.3.	Grupos experimentais	43
4.2.2.	Experimento 2	43
4.2.2.1.	Local e período experimental	43
4.2.2.2.	Animais	43
4.2.2.3.	Grupos experimentais	44
4.3.	Avaliação dos animais	45
4.3.1.	Identificação e idade	45
4.3.2.	Escore de condição corporal	46
4.3.3.	Exame clínico reprodutivo	46
4.3.3.1.	Palpação e ultrassonografia transretal	46
4.3.3.2.	Exame da cérvix	47
4.4.	Coleta de amostras	47
4.4.1.	Lavado uterino de baixo volume	47
4.4.2.	Biópsia uterina	47
4.5.	Exames laboratoriais	47
4.5.1.	Citologia	47

4.5.2.	Histopatologia	48
4.5.2.1.	Inclusão de amostras na parafina	48
4.5.2.2.	Inclusão de amostras na resina	48
4.5.2.3.	Avaliação histopatológica	48
4.5.3.	Histomorfometria	49
4.6.	Insuflação uterina	50
4.7.	Análise estatística	51
5.	RESULTADOS	51
5.1.	Experimento 1	51
5.1.1.	Identificação, anamnese e histórico reprodutivo	51
5.1.2.	Exame clínico reprodutivo	52
5.1.3.	Citologia	52
5.1.4.	Histopatologia	52
5.1.5.	Histomorfometria	54
5.2.	Experimento 2	56
5.2.1.	Identificação, anamnese e histórico reprodutivo	56
5.2.2.	Exame clínico reprodutivo	57
5.2.3.	Citologia	58
5.2.4.	Histopatologia	58
5.2.5.	Histomorfometria	61
6.	DISCUSSÃO	64
7.	CONCLUSÃO	67
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9.	ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através de seu último levantamento, relatou que o rebanho equino brasileiro possui aproximadamente 6 milhões de cabeças (IBGE, 2020), gerando cerca de 3 milhões de empregos diretos e indiretos, além de uma receita total de 16 bilhões de reais por ano (LIMA; CINTRA, 2016). Diante do exposto, evidencia-se a importância da criação de cavalos para a economia nacional, empregando e gerando renda para milhões de famílias. De fato, a crescente procura de animais para cavalgadas e provas equestres vem aumentando a demanda por cavalos com maior valor zootécnico agregado. Nesse contexto as biotecnologias aplicadas à reprodução equina têm ganhado espaço. Estas tecnologias permitem uma maior disseminação de material genético dos reprodutores de maior interesse econômico, gerando maiores lucros aos criadores. Para que se obtenha sucesso na criação de cavalos, as matrizes devem ter boa fertilidade, característica importante sob o ponto de vista econômico.

Diversos aspectos podem afetar a fertilidade equina, como manejo, nutrição, genética, e condição geral e reprodutiva. Um dos maiores problemas encontrados na reprodução dos equinos é a subfertilidade ou infertilidade das fêmeas, sejam elas receptoras, matrizes ou doadoras. Dentre as patologias reprodutivas que geram esta condição, a endometrite é a mais comum, provocando um impacto negativo significativo sobre os índices reprodutivos (SCHÖNIGER; SCHOON, 2020). A endometrite é uma inflamação com curso agudo ou crônico, podendo apresentar características degenerativas do endométrio, que pode estar ligada a infecções bacterianas ou fúngicas. As terapias tradicionais são baseadas em lavados uterinos, administração de drogas ecbólicas, utilização de antibacterianos e antifúngicos, no entanto, nem sempre apresentando resultados satisfatórios (SCOGGIN, 2016). Sendo assim, a busca por tratamentos alternativos tornou-se o foco de novos estudos na reprodução equina.

A ozonioterapia tem sido o centro de pesquisas visando o tratamento de problemas reprodutivos em humanos e animais devido ao seu potencial antimicrobiano e a sua capacidade de reduzir a inflamação tecidual (ÁVILA et al., 2022; CALDERON et al., 2016a). É uma terapia de baixo custo, fácil aplicação e não produz resíduos, além de não induzir resistência dos microrganismos. De fato, a procura por alternativas ao uso dos antimicrobianos tornou-se o objetivo de pesquisas, projetos e legislações com enfoque na saúde única – ONE HEALTH (<https://www.oie.int/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Endometrite

A inflamação do endométrio é considerada a maior responsável pela redução da fertilidade em éguas, sendo também o terceiro maior problema clínico encontrado nos equinos, atrás apenas da síndrome cólica e enfermidades do aparelho respiratório (SIKORA et al., 2016). As éguas podem apresentar dificuldade para gestar, perda embrionária precoce, abortos no terço médio da gestação, placentites e nascimento de potros sépticos (LEBLANC; CAUSEY, 2009). Sendo assim, a endometrite constitui um fator limitante de fertilidade nas fêmeas domésticas e um grande desafio na reprodução equina.

O termo endometrite se refere a inflamação do endométrio. No entanto, essa patologia engloba várias condições e etiologias distintas, o que leva às seguintes classificações: 1. Endometrite prolongada pós-cobertura; 2. Endometrite infecciosa aguda ou crônica/persistente; 3. Endometrite subclínica; 4. Piometra; 5. Metrite; 6. Endometrite venérea (KATILA, 2016; KATILA; FERREIRA-DIAS, 2022).

A endometrite persistente pós cobertura é a principal causa não infecciosa de inflamação do endométrio, devido à sua alta prevalência nos rebanhos equinos, podendo afetar entre 10% e 20% das éguas (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020). Esta afecção é causada pela falha dos mecanismos de defesa uterino em eliminar os antígenos que entram em contato com o útero após a monta natural ou inseminação artificial, resultando em endometrite persistente. Éguas capazes de debelar esta inflamação entre 48 e 72h são consideradas resistentes, enquanto aqueles animais incapazes são considerados susceptíveis à endometrite (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020; KATILA, 2016). Deve-se ressaltar que o termo “endometrite persistente pós cobertura” pode ser interpretado de forma equivocada como uma infecção crônica do endométrio, sendo assim, a nomenclatura mais adequada seria “endometrite prolongada pós cobertura” (KATILA; FERREIRA-DIAS, 2022).

As endometrites infecciosas podem ser classificadas como agudas, com duração de alguns dias, ou crônicas, podendo persistir por uma ou mais semanas. São causadas por agentes bacterianos ou fúngicos, sendo que os fatores predisponentes referentes à égua contribuem para a contaminação do útero (KATILA, 2016; KATILA; FERREIRA-DIAS, 2022). Alguns destes fatores são a idade avançada, defeitos anatômicos ou funcionais, resposta inflamatória uterina exacerbada e colonização do trato reprodutivo por microrganismos patogênicos, sendo que

estes fatores podem atuar isoladamente ou associados no desenvolvimento da endometrite clínica ou subclínica. A endometrite bacteriana é apontada como a maior responsável pelas infecções uterinas: estudos revelam que a sua prevalência varia entre 25-60%, embora grande porcentagem dos casos não sejam diagnosticados (FRONTOSO et al., 2008; RASMUSSEN et al., 2015).

As infecções uterinas que possuem sinais discretos e são apenas encontrados polimorfonucleados (PMN), sem a presença de microrganismos infecciosos, são classificadas como endometrites subclínicas. As inflamações classificadas como piometra são aquelas em que se observa acúmulo de pus no lúmen uterino. Este acúmulo pode acontecer em animais com o útero penduloso, que apresentam a cérvix fechada ou com presença de adesões, impossibilitando a drenagem do conteúdo para o exterior (KATILA, 2016).

Éguas que apresentam infecção uterina e toxemia como consequência de complicações relacionadas ao parto são classificadas com metrite, sendo que esta enfermidade pode acontecer em até uma semana após o nascimento do potro. As endometrites venéreas normalmente são observadas após a monta natural ou inseminação artificial e são caracterizadas pela cultura positiva de alguns microrganismos específicos que possuem transmissão durante a cópula ou via sêmen – causadores da metrite contagiosa equina. A principal bactéria envolvida nesses casos é a *Taylorella equigenitalis*, mas algumas cepas de *Pseudomonas* e *Klebsiella* também podem ser as responsáveis. A endometrite resultante da infecção pela *Taylorella equigenitalis* é transitória, podendo ser acompanhada de descarga vulvar purulenta, vaginite e cervicite, no entanto, algumas éguas permanecem como carreadoras assintomáticas. Vale ressaltar que casos de metrite contagiosa equina devem ser reportados à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (DELERUE et al., 2019; KATILA, 2016; PASOLINI et al., 2016).

Alguns autores realizam essa classificação de forma mais simplificada, em endometrite não infecciosa ou infecciosa. Os sinais clínicos das duas classificações são indistinguíveis, com exceção da possibilidade de identificação do agente etiológico envolvido nos casos infecciosos (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

2.1.1 Agentes Etiológicos

Uma grande variedade de microrganismos patogênicos e oportunistas encontrados no trato urogenital, assim como nas fezes dos animais, podem ascender ao útero durante a monta natural, inseminação artificial ou procedimentos ginecológicos. As bactérias, fungos e leveduras são os responsáveis pelas endometrites infecciosas observadas nas fêmeas domésticas. Na maioria dos

casos essas infecções são causadas por bactérias aeróbias; no entanto, as anaeróbias também apresentam capacidade para colonizar o útero (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

2.1.1.1 Bactérias

As bactérias mais associadas a falhas reprodutivas em éguas são *Escherichia coli* e o *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (β hemolítico) (ALBIHN; BÅVERUD; MAGNUSSON, 2003). Outras bactérias isoladas do útero de éguas incluem: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Actinobacter spp.*, *Proteus spp.* e *Citrobacter spp.* O perfil bacteriano isolado (Quadro 1) pode variar entre os autores, no entanto, certas bactérias são mais comumente associadas com infecções agudas e crônicas como *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* e *Escherichia coli*, respectivamente (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

Quadro 1 - Bactérias comumente isoladas de endometrites e suas principais características.

Bactéria	Características
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	G+, oportunista, potencialmente venérea
<i>Escherichia coli</i>	G-, oportunista, anaeróbio facultativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G+, potencialmente venérea, aeróbio
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G-, oportunista, anaeróbio facultativo, potencialmente venérea
<i>Staphylococcus spp</i>	G+, oportunista, anaeróbio facultativo
<i>Taylorella equigenitalis</i>	G-, sexualmente transmissível, microaerofágico, causa uma endometrite purulenta severa
<i>Enterobacter cloacae</i>	G-, oportunista, anaeróbio facultativo
<i>Proteus spp</i>	G-, oportunista, anaeróbio

G+: gram positivo; G-: gram negativo.

Fonte: Adaptado de CANISSO et al., 2020.

2.1.1.2 Fungos

Éguas acometidas por endometrite fúngica geralmente apresentam alterações anatômicas predisponentes ou histórico de tratamento para endometrite bacteriana no passado. Os

antibacterianos alteram a microbiota do aparelho urogenital, propiciando a proliferação de fungos. Estes microrganismos são responsáveis por uma menor porcentagem das endometrites, cerca de 1 a 5% dos casos, podendo ser encontrados juntamente com infecções bacterianas (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020). Os fungos mais frequentemente isolados são: *Cândida spp.* e *Aspergillus spp.* (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020; WONG; DAVIS; WHITE, 2001) (Quadro 2).

Quadro 2 - Fungos isolados de endometrites e suas principais características.

Fungo	Características
<i>Candida spp.</i>	Levedura, 58 a 69% das endometrites fúngicas
<i>Aspergillus spp.</i>	Hifas septadas, 25-26% das endometrites fúngicas
<i>Mucor spp.</i>	Hifas aseptadas, 5 a 12% das endometrites fúngicas

Fonte: adaptado de CANISSO et al., 2020.

2.2 Fisiopatogenia da endometrite

Durante a monta natural, inseminação artificial ou parto, o útero fica exposto a diversos antígenos, o que resulta em reação inflamatória fisiológica com objetivo de restaurar a homeostase local, visando a manutenção de um ambiente adequado para futura implantação embrionária (PASOLINI et al., 2016). Essa reação inflamatória tem início em até 30 minutos após o contato dos antígenos com o endométrio e deve cessar dentro de 48 a 72h (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

Éguas consideradas susceptíveis demoram mais tempo para desencadear a reação inflamatória e apresentam dificuldade para eliminar os produtos inflamatórios dentro do tempo esperado, desenvolvendo endometrite persistente, capaz de interferir na sua fertilidade (PASOLINI et al., 2016). A presença de debris celulares, produtos inflamatórios e microrganismos no lúmen uterino modificam este ambiente, tornando-o hostil para o embrião, comprometendo o estabelecimento da gestação e a recuperação embrionária. Além disso, a liberação de prostaglandina F_{2α} durante o processo inflamatório pode levar à luteólise prematura, impedindo o estabelecimento de uma gestação devido à diminuição da produção de progesterona. Além disso, a endometrite parece interferir com a placentação, levando a perdas embrionárias precoces (BRITO; BARTH, 2003).

2.2.1 Mecanismos de defesa uterinos

O útero possui um arsenal de mecanismos de defesa que tem por objetivo evitar que os microrganismos cheguem em seu lúmen ou, ao alcançá-lo, sejam rapidamente eliminados. Os mecanismos de defesa uterino são divididos em: (1) barreiras físicas do trato urogenital, (2) mecanismos imunológicos e (3) contratilidade miometrial. Caso qualquer um destes mecanismos esteja comprometido, a égua apresenta-se susceptível à endometrite, com conseqüente redução da fertilidade. Qualquer alteração conformacional ou funcional nestas barreiras favorece a exposição do útero a agentes contaminantes, resultando em infecções e, conseqüentemente, diminuição das taxas de prenhez (RICKETTS; BARRELET, 2001).

2.2.1.1 Barreiras físicas do trato urogenital

Os mecanismos físicos são constituídos de estruturas anatômicas que formam uma barreira à entrada de patógenos no útero, sendo eles a vulva, a prega vestíbulo vaginal e a cérvix (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016). Os lábios vulvares devem ser firmes e se unirem em toda a extensão da vulva, garantindo boa proteção para a mucosa (INOUE; SEKIGUCHI, 2017), além de se apresentar com 2/3 de seu comprimento abaixo do assoalho pélvico. A prega vestíbulo vaginal previne a aspiração de ar e outros debris para a região cranial da vagina, fato especialmente importante no momento do estro. A cérvix não deve possuir lacerações e nem adesões, se apresentar relaxada e aberta durante o estro e contraída e fechada durante o diestro ou gestação (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016).

Alterações anatômicas no trato urogenital permitem a entrada de ar e ou fezes e acúmulo de fluido ou urina na vagina e útero, situações que podem propiciar o desenvolvimento da endometrite. Má conformação da vulva, incompetência da prega vestíbulo vaginal, útero penduloso e incompetência cervical são os principais defeitos anatômicos encontrados em éguas portadoras de endometrite (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020). Defeitos anatômicos adquiridos normalmente se desenvolvem em éguas com idade avançada, maior número de coberturas, gestações e/ou partos (MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020). Éguas idosas podem apresentar diminuição de tônus dos lábios vulvares e, em multíparas, pode-se observar enfraquecimento da prega vestíbulo vaginal (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016; INOUE; SEKIGUCHI, 2017).

2.2.1.2 Mecanismos imunológicos

O sistema imune encontrado nas mucosas é representado pelo sistema adaptativo e o inato. A imunidade adaptativa é mediada pelos linfócitos T, que respondem seletivamente a cada agente agressor. Em contraste, o sistema imune inato responde de forma não seletiva, rápida e transitória após o contato do agente agressor com a mucosa. Este último sistema é o responsável pela resposta imunológica uterina após a monta natural ou inseminação artificial (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

A resposta imune inata é a primeira a se formar para proteger o útero contra microrganismos causadores da endometrite e inicia-se imediatamente após o reconhecimento e sinalização das células epiteliais da mucosa (via *Toll Like Receptor's*). A resposta desse sistema baseia-se em: ativação de citocinas que sinalizam para a migração de células de defesa para o sítio de infecção; ativação da cascata do complemento para a retirada de debris celulares; ativação do sistema imune adaptativo, via apresentação de antígeno e atuação como barreira física contra os microrganismos e partículas que adentram no útero (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

Os *Toll Like Receptor's* são responsáveis por iniciar a resposta imune, ativando as imunoglobulinas e o complemento, que levam à digestão e eliminação dos antígenos, independentemente de sua patogenicidade. Essa resposta predominante do sistema imune inato é responsável pela primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e que permite a exposição repetida de espermatozoides e do próprio embrião sem a formação de anticorpos específicos. Além disso, as células T reguladoras (*Treg cells*), que consistem em uma população específica de linfócitos T, apresentam propriedades reguladoras sobre os linfócitos CD4+ e CD8+, além de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas células são capazes de reconhecer tais antígenos, suprimir a reação inflamatória e a resposta imune (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

Os neutrófilos (polimorfonucleados - PMN) são as primeiras células a migrarem para o lúmen uterino após o reconhecimento dos antígenos, cerca de 30 minutos após o contato desses com o endométrio (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020). Além da infiltração leucocitária, ocorre a produção e secreção de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), resultando em uma resposta imune típica (WIDDERS et al., 1985).

Éguas susceptíveis a endometrite apresentam um desbalanço na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, levando ao aumento da neutrofilia e da produção de citocinas pró-

inflamatórias 24h após o contato endométrio-antígeno, o que resulta em reação inflamatória mais intensa e prolongada em relação às éguas resistentes (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

2.2.1.3 Contratilidade miometrial

A capacidade de drenagem e limpeza uterina é um fator crítico para a eliminação eficiente dos agentes agressores. Durante a monta natural ou inseminação artificial ocorre uma estimulação mecânica da cérvix e da vagina que é capaz de induzir à produção de ocitocina, hormônio relacionado à contratilidade miometrial e consequente eliminação do fluido presente no lúmen uterino. Após a ovulação e fechamento da cérvix, os vasos linfáticos endometriais realizam a eliminação de quaisquer debris celulares ou inflamatórios que se encontram no útero. Alguns defeitos anatômicos como incompetência cervical, má conformação perineal, útero penduloso e enfermidades degenerativas do miométrio ou endométrio interferem nesse processo, levando a um aumento da probabilidade da égua em desenvolver endometrite (MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020).

O contato dos espermatozoides e microrganismos com o endométrio resulta em reação inflamatória, que ativa a cascata do ácido araquidônico e a produção de prostaglandina F₂α (PGF₂α). A PGF₂α, assim como a ocitocina, induz a contratilidade miometrial e promove a depuração mecânica do conteúdo inflamatório para fora do útero (MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020). Éguas consideradas susceptíveis à endometrite apresentam contrações uterinas menos intensas e que tem início somente 4 horas após o contato com os antígenos. Por outro lado, nas éguas consideradas resistentes, a contração miometrial é mais eficiente e inicia-se imediatamente após o contato (LEBLANC; ASBURY; LYLE, 1989; TROEDSSON et al., 1993).

2.2.1.4 Outros fatores

O status nutricional e o balanço energético são fatores capazes de influenciar a fertilidade da fêmea por diversas razões (FRADINHO et al., 2014). Éguas que apresentam bom escore de condição corporal (ECC) saem do anestro aproximadamente um mês antes dos animais com ECC abaixo do ideal. Além disso, animais com peso ideal e que se encontram em locais com luminosidade e temperatura adequados, possuem mais chances de apresentarem estro durante o ano todo (DINI et al., 2019).

No que diz respeito à endometrite, animais com ECC muito baixo podem apresentar deslocamento cranial do ânus, levando a uma conformação inclinada do períneo, o que predispõe à entrada de fezes e urina na vagina (INOUE; SEKIGUCHI, 2017). Essa condição anatômica também é frequentemente observada em éguas velhas, assim como a degeneração endometrial, fatores comumente observados em animais com endometrite (SCOGGIN, 2015). Em éguas idosas ocorre uma alteração nos receptores da ocitocina e da $PGF2\alpha$, que levam à diminuição da liberação do cálcio intracelular e consequente redução da contratilidade uterina (MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020). Além disso, determinadas categorias de éguas, como as doadoras de embriões, são mais susceptíveis à endometrite em função dos sucessivos lavados uterinos durante diversas estações de monta. Os lavados uterinos recorrentes podem causar alterações endometriais a longo prazo, sendo possível observar piora na classificação da biópsia endometrial dessas éguas (Quadro 7) (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020; SQUIRES, 2013).

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da endometrite inclui a anamnese completa do animal, a realização do exame físico geral e específico ginecológico e, por fim, a coleta de material para avaliação laboratorial.

2.3.1 Histórico

Comumente éguas com endometrite possuem histórico de acúmulo de líquido intrauterino, perdas embrionárias precoces, retorno precoce ao estro, presença de secreção vulvar e ou incapacidade de gestar, mesmo com uso de garanhões férteis e inseridas em um bom programa reprodutivo (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

2.3.2 Exame físico

2.3.2.1 Escore de condição corporal

A avaliação do escore de condição corporal (ECC) é um dos métodos de predição da nutrição de um animal e sua estimativa é considerada importante devido à relação entre a ECC e o desempenho reprodutivo de éguas. Consiste na avaliação subjetiva da adiposidade do animal e, mesmo podendo apresentar variações entre os avaliadores, é considerado um dado importante e confiável sobre o status nutricional (MORLEY; MURRAY, 2014).

Os animais são classificados em uma escala que varia de 1 a 9, conforme HENNEKE et al. (1983), de forma que os animais estimados na categoria 1 são aqueles extremamente magros e sem nenhuma deposição de gordura, enquanto os animais na categoria 9 são aqueles com

excesso de deposição de gordura corporal (Anexo 1). Essa classificação é realizada observando-se e palpando pontos de deposição de gordura em regiões específicas do corpo: inserção da cauda, processos espinhosos lombares, borda dorsal do pescoço, cernelha, região caudal da escápula e costelas.

HENNEKE et al.,1984 avaliou o ECC de 900 éguas no início do período reprodutivo e comparou os grupos em relação a porcentagem de animais gestantes e o número de ciclos até a concepção ao final da estação de monta. Constatou que animais classificados com ECC abaixo de 5 (Anexo 1) demoraram mais ciclos até gestarem e possuíam taxas de gestação inferiores em relação às éguas com ECC mais altos, sendo assim, sugere que o ECC mínimo para a melhor eficiência reprodutiva é o escore 5.

2.3.2.2 Avaliação do períneo

Inicialmente deve-se avaliar o fechamento dos lábios vulvares, uma vez que a integridade desta estrutura é um fator importante na prevenção de infecções ascendentes. Posteriormente, avalia-se a inclinação dorso ventral da vulva, que deve se apresentar verticalmente posicionada, com inclinação não superior a 10° em relação ao solo. Por fim, avalia-se o posicionamento da vulva em relação ao assoalho pélvico, que deve se apresentar com 2/3 de sua extensão abaixo dessa estrutura (PINTO, 2014).

A avaliação da funcionalidade da prega vestibulo-vaginal é realizada durante a avaliação do períneo. O teste *windsuck* é realizado mediante a separação dos lábios vulvares e a percepção se ocorre ou não a entrada de ar em direção à vagina. Éguas com alterações na prega vestibulo-vaginal são positivas para o teste *windsuck*, ou seja, ocorre a passagem de ar para dentro da vagina (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016).

2.3.2.3 Vaginoscopia e palpação digital da cérvix

A vaginoscopia é realizada utilizando-se um espécuro vaginal de Polansky, específico para equinos. Para o exame, este instrumento deve ser bem lubrificado e inserido através dos lábios vulvares em angulação de 30° em relação ao solo e, em seguida, deve ser colocado na posição horizontal. Uma certa resistência à passagem pelo esfíncter vestibulo-vaginal pode ser percebida caso esta estrutura se apresente íntegra (PINTO, 2014). Além disso, ao avançar e retornar com o espécuro, o esfíncter deve demonstrar aposição satisfatórias de suas bordas (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016). Após a passagem e ao atingir a

vagina, o espéculo é posicionado horizontalmente e uma fonte de luz é direcionada para a observação do canal vaginal (PINTO, 2014).

Este exame permite a observação de alterações na vagina e cérvix, como aderências, presença de secreção purulenta e hiperemia. Em determinadas condições, o escaneamento detalhado do assoalho vaginal e da cérvix se fazem necessários por meio da palpação digital. Além disso, deve-se avaliar a apresentação da cérvix e correlacionar com a fase do ciclo estral em que a égua se encontra, conforme descrito no quadro 4 (PINTO, 2014).

Quadro 4 - Mudanças cíclicas da cérvix, avaliadas por vaginoscopia e palpação digital.

	Estro	Diestro	Anestro	Gestação
Diâmetro da cérvix (nº de dedos)	Mais que 3	1	1-3	1
Cor da mucosa cervical	Avermelhada	Cinza pálida ou amarelada	Branca pálida	Branca
Aparência geral	Edematosa, brilhante e aberta	Seca e fechada	Seca e possivelmente aberta	Seca e fechada
Posição da cérvix	No assoalho da vagina	Posicionada na parede cranial da vagina	Posicionada na parede cranial da vagina	Posicionada na parede cranial da vagina

Fonte: Adaptado de PINTO, 2014.

2.3.2.4 Palpação transretal

A palpação transretal é o método mais antigo utilizado para o diagnóstico de problemas reprodutivos em éguas. No entanto, a ultrassonografia vem demonstrando ser um método mais sensível e específico. Deve-se levar em consideração que para a avaliação do tamanho, tônus e posição do útero assim como o da cérvix, a palpação é ainda o método mais indicado (KATILA, 2016).

2.3.2.5 Ultrassonografia transretal

A ultrassonografia pode ser utilizada para identificação da fase do ciclo estral, mensuração do diâmetro dos cornos uterinos, detectar a presença de edema uterino exacerbado, cistos endometriais e gestações (incluindo as gemelares) (KATILA, 2016).

No diestro observa-se a presença de pelo menos um corpo lúteo ativo, tônus uterino e cervical e, ausência de edema. As fêmeas classificadas em estro apresentam edema uterino, folículo maior do que 25mm e cérvix flácida (DIEL DE AMORIM et al., 2016). No útero de éguas em estro, o edema uterino está presente e diminui quando se aproxima da ovulação, refletindo a influência do estrógeno neste órgão. No entanto, a persistência de um edema alto ou o seu aumento perto da ovulação são associados com diminuição das taxas de prenhez (KATILA, 2016). Os animais com útero sem tônus, sem edema, ambos os ovários sem a presença de folículos acima de 20mm e/ou corpo lúteo, são classificadas como acíclicas (AUPPERLE et al., 2003; HUGHES; STABENFELDT; EVANS, 1977).

Na suspeita de endometrite, a imagem ultrassonográfica é utilizada visando escanear o útero em busca de alterações, entre elas, a presença de líquido intrauterino (LIU). Sempre que observada a presença de LIU, recomenda-se a sua mensuração, considerando-se patológico uma coluna de líquido maior que 2cm durante o estro ou a presença de qualquer quantidade durante o diestro (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016; FERRIS, 2016; MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020). A avaliação da ecogenicidade desse líquido pode ser útil na decisão de quais outras técnicas de diagnóstico devem ser empregadas, assim como na terapêutica adequada de cada caso. No entanto, vale ressaltar que nem todas as éguas com endometrite apresentam LIU e a ultrassonografia não é o método mais sensível para o diagnóstico dessa enfermidade (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

2.3.3 Métodos laboratoriais de diagnóstico

2.3.3.1 Coleta de amostras

Para coleta de material a égua deve estar contida em tronco adequado e ter sua cauda isolada a fim de evitar qualquer nível de contaminação. O períneo é então higienizado com sabão e água limpa, atentando-se ao fato de não deixar quaisquer resíduos na região, que deve ser seca mediante a utilização de papel toalha descartável (FERRIS, 2016).

Dentre as opções de métodos para colheita de material, o *swab* e a escova citológica são os mais utilizados pelos profissionais a campo devido à sua praticidade. No entanto, tais

instrumentos permitem o acesso de uma pequena porção do endométrio da égua, o que tornam o diagnóstico passível de falsos-negativos (FERRIS, 2016).

O procedimento para a colheita de material realizada via *swab* e escova citológica é semelhante. O técnico guia manualmente o instrumento, que passa pela vagina e cérvix, chegando ao útero. A ponta do instrumento é então colocada em contato com o endométrio e rotacionada três vezes para a aquisição do material (RUA et al., 2018). Alguns autores sugerem que o *swab* fique em contato com o endométrio por 20 a 30 segundos caso a amostra seja utilizada para cultura microbiológica (FERRIS, 2016). Logo em seguida, o material é colocado em uma lâmina de microscopia, realizando-se movimentos gentis de rolamento da ponta do *swab* ou da escova sobre a lâmina e, por fim, realiza-se a coloração da amostra. Se as amostras forem destinadas para a cultura microbiológica, o material deve ser semeado em placas para crescimento bacteriano ou fúngico (RUA et al., 2018).

O método de coleta via *swab* apresenta como principais limitações os possíveis danos às células coletadas e, com isso, a redução da sensibilidade diagnóstica. Além disso, há uma baixa celularidade obtida e maior quantidade de artefatos observados em amostras provenientes de *swab* quando comparadas à escova citológica, tornando o método menos eficiente para a detecção de inflamação uterina (FERRIS, 2016).

Éguas que apresentam sinais clínicos sugestivos de endometrite infecciosa mas que apresentem resultados negativos no *swab* ou na escovinha citológica devem ser submetidas a um método de coleta que permita a obtenção de uma amostra mais representativa do lúmen uterino, como o lavado de baixo volume (LBV) (FERRIS, 2016). A amostra recolhida por essa técnica pode ser utilizada tanto para a citologia quanto para o cultivo microbiológico. No entanto o LBV não é a técnica de escolha na rotina por demandar maior tempo de execução e risco de contaminação da amostra com os microrganismos presentes na genitália caudal. Além disso, a técnica apresenta outras limitações como a necessidade de experiência tanto do profissional quanto do assistente; ser de difícil execução quando a coleta for realizada em égua com útero penduloso; e a necessidade de decantação ou centrifugação, especialmente importante em casos de amostras excessivamente diluídas (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

Para realização de LBV, utiliza-se uma sonda uterina do tipo bivona com *cuff*, que deve ser passada via transcervical até o útero. O responsável pela coleta guia manualmente a sonda e infunde entre 150 e 500 mL de soro Ringer com Lactato ou NaCl 0,9% no lúmen uterino. A

solução deve ficar em contato com o endométrio por pelo menos 30 segundos, enquanto o operador realiza massagem uterina via transretal (FERRIS, 2016; RUA et al., 2018). O fluido é recolhido utilizando um sistema fechado para coleta, e então classifica-se o aspecto da amostra em limpo ou turvo (RUA et al., 2018). Em algumas situações, como em úteros pendulosos, recomenda-se a administração de 20 UI de ocitocina intravenosa para auxiliar na recuperação do fluido (FERRIS, 2016).

O material recuperado pelo método do LBV pode ser encaminhado para avaliação citológica e ou para cultivo microbiológico. Em ambas as situações, as amostras devem ser centrifugadas a 400-600g por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, uma alíquota do *pellet* formado no fundo do tubo é alocada sobre uma lâmina de vidro e corada ou o *pellet* é ressuspensionado com o sobrenadante e espalhado entre duas lâminas de microscopia para avaliação citológica. Caso o material seja destinado para o cultivo microbiológico, uma alíquota do *pellet* é então semeada em placa para cultivo (FERRIS, 2016; RUA et al., 2018).

O processamento do material obtido pelo LBV pode resultar em lesão celular decorrente da centrifugação, embora essa alteração não interfira na conclusão diagnóstica. A utilização do LBV apresenta maior sensibilidade em relação à avaliação citológica e microbiológica quando comparada ao *swab* e à escova citológica, ocorrendo, portanto, menor frequência de falso-negativos (FERRIS, 2016).

Ainda, em relação à coleta de material para diagnóstico da endometrite, a biópsia é considerada o padrão ouro por ser método mais confiável para se verificar tanto a saúde quanto as patologias uterinas. A avaliação histológica permite a investigação detalhada da arquitetura tecidual, porém, pelo fato de uma única biópsia representar entre 0,1 a 0,2% de toda a superfície uterina, em alguns casos é necessário a realização de mais de uma coleta amostral (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011) ou então associar a mais um método de diagnóstico.

A coleta para a biópsia uterina pode ser realizada em qualquer fase do ciclo estral, embora a arquitetura celular do endométrio se altere durante as diferentes fases do ciclo, se apresentando menos modificada durante o diestro. Mesmo que a cérvix esteja fechada neste período, a sua fácil dilatação manual permite a coleta da amostra. Não é recomendada a coleta de amostras nos períodos de transição, tanto de primavera quanto de outono, devido ao fato de que, nesse período, as estruturas endometriais tendem a se apresentar atrofiadas, o que acarretaria um diagnóstico menos preciso. Se nenhuma anormalidade focal é diagnosticada via

palpação, o melhor local para a biópsia é a junção entre o corno e o corpo do útero, podendo ser tanto da região dorsal quanto da região ventral (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011).

Para coleta de material utiliza-se uma pinça específica devidamente esterilizada que deverá ser encaminhada via transvaginal até a cérvix. Ao introduzi-la no útero, o operador guia a pinça via transretal para a melhor posicionamento do instrumento. A pinça é aberta e colocada em contato com o endométrio; e então, realiza-se uma leve pressão sobre o útero para a retirada da amostra (FERRIS, 2016; RUA et al., 2018).

A amostra coletada para biópsia uterina também pode ser utilizada para avaliação citológica, realizando uma impressão em lâmina de vidro e corando-a para avaliação em microscópio. A cultura microbiológica também pode ser obtida por meio do material colhido para biópsia, considerando que ocorre uma melhora na sensibilidade em relação à utilização do *swab*, sugestivo de que as bactérias podem estar presentes nas camadas mais profundas do endométrio e não apenas na sua superfície (FERRIS, 2016).

2.3.3.2 Processamento e avaliação

2.3.3.2.1 Citologia endometrial

O exame de citologia endometrial consiste na observação quantitativa/qualitativa de células inflamatórias, do epitélio e lúmen uterino. É considerada uma técnica rápida, de fácil emprego e baixo custo. Permite a avaliação do tipo e proporção das células inflamatórias em relação às células endometriais podendo, ocasionalmente, detectar a presença de colônias bacterianas, hifas e cristais de urina (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020). As amostras coletadas podem ser coradas utilizando-se o panótico rápido ou *Wright Stain* modificado e avaliadas utilizando-se um microscópio com aumento de 400x ou de 1000x sob óleo de imersão (FERRIS, 2016; RUA et al., 2018).

A avaliação das lâminas deve ser completa e sistemática. Podem ser observadas estruturas como células epiteliais endometriais, debris, células da linhagem branca, eritrócitos, bactérias, fungos e leveduras. As células epiteliais se apresentam cuboides durante o anestro e colunares durante o estro, sendo que a maioria não é ciliada, embora algumas dessas células com cílios possam ser observadas. A presença de células escamosas é comum em éguas no pós-parto, em casos de urovagina (com refluxo para o útero) e contaminação da amostra com células cervicais. Uma grande proporção de células degeneradas pode indicar erros na preparação da amostra ou endometrite infecciosa crônica (FERRIS, 2016).

O debris encontrados devem ser classificados em: ausentes/ mínimos (menos que 25% da lâmina), leve (25-50% da lâmina) e moderado/severo (mais que 75% da lâmina). A presença de quantidade moderada à severa de debris tem sido associada à endometrite (FERRIS, 2016).

Os neutrófilos são as células da linhagem branca mais comumente observados em citologias uterinas e se apresentam com um núcleo segmentado entre 3 e 5 lóbulos. Éguas em estro, sem alterações uterinas, devem apresentar nenhum ou poucos neutrófilos na citologia. Essas células podem estar presentes após a monta natural, inseminação artificial, lavagem uterina e no pós-parto, sem significar a ocorrência de algum processo patológico (FERRIS, 2016).

Para classificação da intensidade da inflamação endometrial, realiza-se a contagem de neutrófilos normalmente em 10 campos aleatórios da lâmina. A partir dessa contagem, a inflamação endometrial é classificada em: 1. Normal (0-raros); 2. Inflamação leve (1-2 neutrófilos por campo); 3. Inflamação moderada (3-5 neutrófilos por campo); 4. Inflamação severa (mais que 5 neutrófilos por campo). Porém, para avaliação de amostras provenientes de LBV, essa técnica pode não ser a mais indicada. Nesses casos, a avaliação citológica é realizada comparando a proporção entre células epiteliais e os PMNs: uma proporção de um PMN para 20 a 40 células epiteliais tem sido utilizado como parâmetro para categorizar as inflamações uterinas (FERRIS, 2016). Alguns autores sugerem que deve-se considerar éguas com endometrite aquelas que apresentam mais de 1 PMN para 100 células endometriais, com o objetivo de aumentar a sensibilidade da citologia (DIEL DE AMORIM et al., 2016).

A interpretação de citologias coletadas via LBV pode ser realizada também pela contagem de 10 campos; no entanto, pode ocorrer uma maior concentração de células em relação a coleta pelo *swab* e pela escova citológica. Dessa forma, sugere-se que a interpretação dos resultados seja: 1. Normal (menor ou igual a 1); 2. Inflamação leve (5-10 neutrófilos por campo); 3. Inflamação severa (mais que 10 neutrófilos por campo) (FERRIS; BOHN; MCCUE, 2015).

A observação de eritrócitos nas amostras uterinas pode ser comum em baixas quantidades em éguas saudáveis (menor que 4 eritrócitos por campo de alta potência). Grande quantidade dessas células pode indicar irritação do endométrio devido à infecção, infusões uterinas ou a método de coleta inadequado (FERRIS, 2016).

A presença de bactérias nas amostras deve ser confirmada com o aumento de 1.000x para a diferenciação correta dos debris celulares. Em relação aos fungos e leveduras, a sua detecção na citologia pode ser a única forma de diagnóstico, pois nem sempre esses organismos crescem durante a cultura microbiológica (FERRIS, 2016).

2.3.3.2.2 Cultura microbiológica uterina

A cultura microbiológica é a técnica indicada para isolar e identificar o agente etiológico de endometrites de caráter infeccioso e deve ser acompanhada da realização de antibiograma, visando auxiliar o médico veterinário na decisão do tratamento mais adequado e efetivo.

Para tanto, as amostras obtidas devem ser semeadas em meios de crescimento apropriado para os microrganismos mais comumente encontrados no ambiente uterino. Os meios mais utilizados para cultura bacteriana são o ágar tripticase de soja (TSA) com 5% de sangue de carneiro, ágar McConkey e ágar cromogênico. Para a cultura fúngica, utiliza-se o ágar sabouraud, que possui cloranfenicol em sua composição, para evitar o crescimento de bactérias (FERRIS, 2016).

Após serem semeadas, as placas para cultivo bacteriano são incubadas a 37° C por 48h e então, observa-se tanto a presença e quantidade de colônias quanto a sua morfologia (Quadros 5 e 6). Em situações que ocorre o crescimento de mais de três patógenos, deve-se considerar a ocorrência de contaminação durante a coleta da amostra (RUA et al., 2018). Ferris (2016) recomenda a observação da placa de cultivo bacteriano por até 72h, visando conferir o crescimento tardio de algumas bactérias. Devido ao crescimento fúngico ser mais lento, recomenda-se um tempo de cultivo maior, podendo estender por até 4 semanas (SCOTT, 2020).

Quadro 5 - Determinação do crescimento bacteriano relativo ao número de colônias após 24 ou 48h de incubação

Crescimento	Número de colônias
Sem crescimento	0
Discreto	Duas ou mais colônias na primeira região inoculada
Pequeno	3 a 5 colônias na primeira região inoculada
Moderado	>5 colônias na segunda região inoculada
Exacerbado	>5 colônias na terceira região inoculada

Fonte: Adaptado de FERRIS, 2016.

Quadro 6 - Características dos principais microrganismos encontrados no útero de éguas

Organismo	Coloração de Gram	Morfologia	TSA + % sangue de carneiro	MacConkey
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	+	Cocos, cadeias	Colônias pequenas, redondas e com beta hemólise (0,5-1mm)	Sem crescimento
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacilos	Colônias de cor creme a cinzas +/- alfa hemólise (2-3mm)	Colônias de tamanho médio, de cor cinza a rosa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Bacilos	Colônias grandes cinzas e mucoides (2-4mm)	Colônias grandes, mucoides de cor rosa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Bacilos	Colônias azul metálico lisas (3-4mm)	Colônias grandes de cor verde claro
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Cocos, formato de “cacho de uva”	Colônias médias, de coloração creme à douradas +/- beta hemólise (2-3mm)	Sem crescimento ou crescimento limitado de colônias rosa
<i>Candida albicans</i>			Colônias brilhantes, macias e altas	

Fonte: Adaptado de FERRIS, 2016.

As amostras de LBV devem ser diretamente inoculadas nas placas, de forma a espalhar o material em 30 a 50% da superfície com movimentos de trás para frente. Utilizando-se uma haste estéril, realiza-se uma passagem na região da placa já inoculada e em seguida leva-se a haste para uma região da placa que ainda não foi inoculada, de forma a semear a amostra nos quatro quadrantes da placa. O objetivo desse procedimento é diluir ou espalhar as colônias, possibilitando melhor visualização e caracterização (FERRIS, 2016).

Alguns autores sugerem que apenas a cultura fúngica positiva não seja suficiente para o diagnóstico preciso de endometrite, se fazendo necessária a realização de citologia e/ou biópsia uterina em conjunto, sendo que essas devem demonstrar resposta inflamatória à presença desses microrganismos (WONG; DAVIS; WHITE, 2001).

A realização do antibiograma é sempre recomendada, por se tratar de um exame de baixo custo e de fácil execução, que pode auxiliar no tratamento a ser instituído. A colônia bacteriana isolada é semeada em ágar Mueller Hinton, onde é aplicado discos embebidos com os antibacterianos de escolha sobre a placa. Após um período de 18 a 24h de incubação, o halo de inibição formado ao redor dos discos é mensurado e a colônia é classificada em susceptível ou resistente a cada antibacteriano específico (FERRIS, 2016).

2.3.3.2.3 Histologia endometrial

A histopatologia endometrial é o método de diagnóstico de endometrite mais sensível, sendo considerado o padrão ouro, principalmente nos casos que apresentam degeneração e inflamações mais profundas no endométrio (DIEL DE AMORIM et al., 2016). Para a avaliação de material destinado à histologia é necessária a fixação em formol 10% ou, preferencialmente, em meio Bouin, por preservar melhor as estruturas celulares e ser indicado para visualização de biofilme. Após 24h de contato da amostra com a solução, a mesma é colocada em álcool 70% ou formol 10% para evitar que o tecido enrijeça em demasia. Após a fixação, as amostras são embebidas em parafina para se realizar os cortes histológicos (entre 3 e 4 μ m) e em seguida realizar a coloração rotineira com hematoxilina eosina. Pode-se também utilizar o tricrômio de Masson's que realça os tecidos conectivos, permitindo uma melhor visualização de fibrose (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011).

Os parâmetros mais importantes a serem avaliados são: 1. Fibrose; 2. Inflamação; 3. Agentes infecciosos; 4. Má diferenciação das células endometriais. Outros achados podem ser relevantes como edema, formações císticas, lacunas linfáticas, lesões vasculares e neoplásicas (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011).

As células encontradas no estroma endometrial são capazes de produzir colágeno em resposta a estímulos ou injúrias; sendo assim, a sua presença ao redor das glândulas endometriais indica processo patológico. A principal causa de fibrose periglandular é a inflamação crônica, mas deve-se levar em consideração que um pequeno grau de fibrose pode

ser observado em éguas no período de anestro (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011) (Quadro 7).

Quadro 7 – Classificação e prognóstico de biópsias endometriais em éguas

Categoria	Alterações histopatológicas	Predição de gestação (%)
I	Endométrio preservado Inflamação leve e focal	80-90
IIA	Inflamação leve a moderada Fibrose multifocal com 1 a 3 camadas de fibroblastos cercando as glândulas ou <2 ninhos fibróticos por 5mm de campo	50-80
IIB	Inflamação moderada Fibrose multifocal ou difusa com 4 ou mais camadas de fibroblastos cercando as glândulas ou 2 a 4 ninhos fibróticos por 5mm de campo	10-50
III	Inflamação severa Fibrose difusa e com 5 ou mais ninhos fibróticos por 5mm de campo	10

Fonte: Adaptado de KENNEY e DOING (1986).

A inflamação pode ser classificada de acordo com o seu tempo de desenvolvimento (aguda ou crônica), com a sua gravidade (leve, moderada e severa) e com o tipo celular presente (linfócitos, neutrófilos, e outros), podendo ser observado também outros padrões como inflamações difusas ou focais e perivascular ou intersticial (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011) (Quadro 7).

Por vezes, os fungos e as bactérias podem ser observados em cortes histológicos sendo que a morfologia pode ser evidenciada mediante a utilização de diferentes corantes como a coloração de Gram para bactérias e a de Gomori ou PAS para fungos. A associação quanto à morfologia e a localização podem prover informações sobre sua identidade, significância e auxiliar na coleta de outras amostras via *swab* (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011).

Considerando o ponto de vista da sua morfologia funcional, as más diferenciações endometriais podem ser classificadas em desiguais, quando duas amostras são avaliadas sendo que uma delas o epitélio apresenta morfologia compatível com o ciclo estral ovariano e a segunda amostra não compatível. Esta alteração é normalmente encontrada em animais com desordens endometriais que afetam a expressão dos receptores de hormônios esteroides. Pode-se observar também uma má diferenciação irregular; neste caso os padrões secretórios ou

proliferativos não podem ser atribuídos a nenhuma diferenciação fisiológica, provavelmente causada por tratamentos hormonais, desordens ovarianas e ou neoplasias (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011).

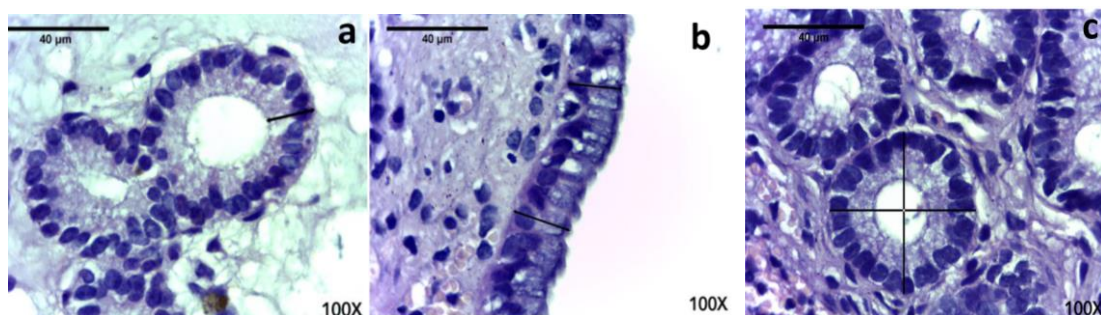
A distinção de endometrite aguda e um processo crônico pode ser realizada pela avaliação histológica. A presença de infiltrados de polimorfonucleados é indicativa de uma endometrite aguda, diferentemente da endometrite crônica em que se observa fibrose periglandular e alterações degenerativas ou necróticas nas glândulas endometriais (RICKETTS; BARRELET, 2001).

2.3.3.2.4 Histomorfometria

Histomorfometria é a mensuração das estruturas histológicas, sendo considerado um método de diagnóstico objetivo e altamente preciso, por aumentar a capacidade de identificação das patologias (HERRERA et al., 2018).

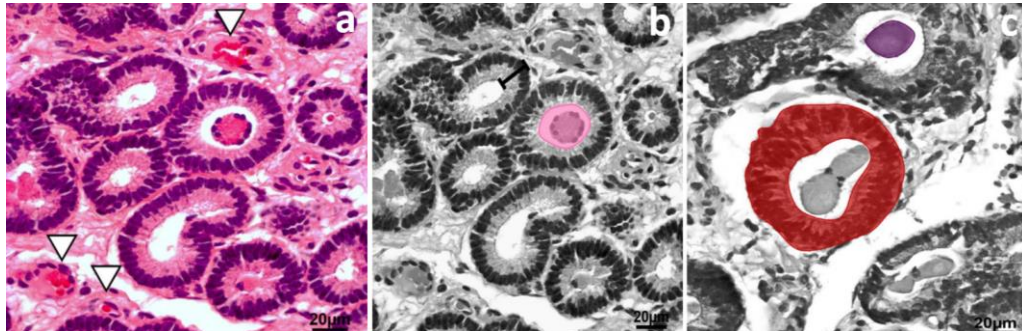
A estrutura a ser mensurada varia entre os autores e o objetivo específico de cada estudo. HERRERA et al., (2018) avaliaram a diferença histológica entre éguas susceptíveis e resistentes à endometrite, utilizando a mensuração da altura do epitélio luminal e do epitélio glandular, diâmetro glandular (Imagem 1) e número de glândulas endometriais por campo. FERREIRA et al. (2021), ao avaliarem o efeito angiogênico do tratamento intrauterino com ozônio, optaram pela inclusão de parâmetros vasculares na mensuração, como o número de vasos endometriais, além da área glandular total, área do lúmen glandular e área de secreção intraglandular (Imagem 2).

Imagem 1: Histomorfometria endometrial demonstrando a mensuração da altura do epitélio luminal (a), altura do epitélio glandular (b) e do tamanho glandular (c)



Fonte: HERRERA et al., 2018.

Imagem 2: Histomorfometria endometrial evidenciando a presença de vasos sanguíneos (a), área luminal glandular (b), mensuração da área glandular total e área de secreção intraglandular (c)



Fonte: FERREIRA et al., 2021.

2.4 Tratamento

O primeiro objetivo do tratamento da endometrite deve ser a correção de defeitos anatômicos que possam interferir na funcionalidade do trato urogenital, de forma a evitar reinfecções (WONG; DAVIS; WHITE, 2001). As correções normalmente requerem procedimentos cirúrgicos, entre eles podemos citar a vulvoplastia, reconstrução de períneo e a transecção de períneo (INOUE; SEKIGUCHI, 2017).

Os tratamentos tradicionalmente empregados para a endometrite são baseados em terapias multimodais utilizando uma combinação de antibacterianos/antifúngicos, drogas ecbólicas, lavados uterinos e anti-inflamatórios (CANISSO; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, 2020).

2.4.1 Antibacterianos e antifúngicos

A terapêutica aplicada deve ser específica para cada animal e, preferencialmente, guiada pelo resultado da cultura microbiológica e antibiograma. De fato, o uso criterioso e responsável dos antibacterianos deve ser um dos principais objetivos do tratamento (MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020). A terapia de endometrites infecciosas pode ser realizada pela via tópica (infusões uterinas) e/ou sistêmica (intravenosos, intramusculares ou oral). Deve-se levar em consideração que não é recomendado a utilização de drogas ecbólicas (ocitocina e prostaglandina) após uma infusão uterina com antibacterianos, devido à indução da contração miométrial e consequente expulsão precoce da medicação do lúmen uterino (FERRIS, 2017).

Por muito tempo a justificativa da administração de antibacterianos via infusões uterinas se deu pelo receio da via sistêmica causar disbiose intestinal, especialmente na espécie equina. No entanto, ao optar pela utilização de infusões deve-se levar em consideração que cada administração resulta na passagem da sonda via cérvix (podendo causar lesões), a ocorrência de inativação do medicamento devido a presença de debris inflamatórios no lúmen uterino, a possibilidade de inflamação e infecção por outros microorganismos de forma iatrogênica. Além disso, não há garantias que a infusão foi capaz de entrar em contato com todo o endométrio de forma homogênea (MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020). Vale ressaltar ainda que o uso repetido de antibacterianos em lavados uterinos pode ocasionar uma disbiose da microbiota vaginal, predispondo o aparecimento de infecções fúngicas oportunistas. (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016).

As recomendações quanto as vias de aplicação variam de acordo com os autores, onde CANISSO et al., 2016, recomenda a utilização de antibacterianos sistêmicos sempre que possível. Nesses casos, deve-se optar por medicamentos que possuam afinidade pelo endométrio e lúmen uterino, como a amicacina, ampicilina, ceftiofur, enroflorxacina, gentamicina, metronidazol, sulfametoxazol com trimetoprim, penicilina potássica e procaína. FERRIS., 2017, relata que os casos de endometrites bacterianas agudas podem ser tratadas apenas com antibióticos intrauterinos; no entanto, em casos crônicos causados por bactérias ou por fungos, o uso de antibacterianos sistêmicos e tópicos associados pode ser necessário. Além disso, recomenda-se em casos que os resultados laboratoriais ainda não chegaram, a realização de infusões uterinas com o ceftiofur sódico (1g reconstituído para 20 a 60 ml) como antibacteriano para o tratamento empírico destes animais (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016; FERRIS, 2017).

Uma das principais classes de antifúngicos utilizados para o tratamento de endometrites são os azóis, e, dentro dessa classe tem-se dois grupos de medicações de maior relevância, os imidazóis e os triazóis. Os imidazóis atuam inibindo a síntese do ergosterol na parede celular dos fungos, levando a uma maior permeabilidade de membrana e consequente morte celular, sendo classificados como fungicidas. O clotrimazol é um exemplo de antifúngico pertencente ao grupo dos imidazóis, que pode ser utilizado em infusões uterinas na dose de 500 a 700mg (WONG; DAVIS; WHITE, 2001).

O fluconazol e o itraconazol pertencem ao grupo dos triazóis e são capazes de inibir a biossíntese do ergosterol, sendo considerados fungistáticos. O fluconazol, diferentemente dos demais antifúngicos, apresenta boa absorção gastrointestinal e distribuição no organismo. Este

fármaco é de alto custo, mas deve ser considerado uma opção para casos endometrites graves, principalmente se a medicação tópica não tiver sido eficaz. A dose recomendada para a utilização do fluconazol pela via oral é de 10mg/kg no primeiro dia e, depois, a manutenção do tratamento é realizada com a dose de 5mg/kg, por 2 a 3 semanas. É possível também realizar a infusão uterina, recomendada por 5 a 7 dias, utilizando a dose de 100 a 500mg (SCOTT, 2020; WONG; DAVIS; WHITE, 2001).

Os antifúngicos normalmente precisam de um ambiente ácido para a sua melhor absorção tópica, sendo assim, recomenda-se uma lavagem com ácido acético previamente à infusão uterina com o medicamento (WONG; DAVIS; WHITE, 2001).

2.4.2 Drogas ecbólicas

A ocitocina e a prostaglandina F2 α (PGF2 α) têm sido utilizados como agentes ecbólicos, devido a sua ação de estimular a contração uterina e eliminar o acúmulo de LIU através da cérvix ou dos vasos linfáticos. A ocitocina (20UI intramuscular ou intravenosa) induz a contrações fortes por um período de tempo de aproximadamente 45 minutos. A PGF2 α (dinoprost trometamina - Lutalyse®) na dose de 5 mg/ intramuscular, produz contrações brandas, porém por um período de tempo de aproximadamente 2h. A escolha do agente varia de acordo com as particularidades de cada égua, por exemplo, éguas com útero penduloso apresentam melhores resultados com contrações uterinas mais prolongadas (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016; NIIKURA et al., 2021).

O tratamento de éguas com endometrite persistente pós-cobertura com ocitocina pode iniciar 6h antes ou 6h depois da inseminação artificial (IA). O intervalo de aplicação varia entre 2 e 8h e recomenda-se a utilização de baixas doses (20 UI) ao invés de altas doses (40 UI), por ser mais efetivo, propiciando contrações cíclicas em vez de contrações “tetânicas” que podem atrapalhar na drenagem do LIU (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016).

A PGF2 α possui algumas limitações que devem ser consideradas no delineamento do tratamento de cada animal. Este medicamento pode estar associado a formação de folículos hemorrágicos anovulatórios, não sendo recomendado para éguas com histórico de formação desse tipo de folículo. Adicionalmente, não deve ser administrado em éguas após a ovulação, por interferir na formação do corpo lúteo e conseqüentemente, na secreção de progesterona (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016; FERREIRA et al., 2018).

2.4.3 Lavados uterinos

O lavado uterino é comumente empregado para o tratamento de endometrite e tem como objetivo a remoção física de microrganismos, espermatozoides, debris celulares e produtos inflamatórios que podem ser os responsáveis por uma inflamação endometrial prolongada (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016).

A solução de Ringer com Lactato é a mais comumente empregada, podendo-se ou não associar com mucolíticos ou agentes quelantes para potencializar o lavado. Em éguas com endometrite pós-cobertura utiliza-se cerca de 2 a 5 litros de solução para o procedimento, no período de 6 a 24h após a inseminação artificial. Para os melhores resultados é necessária a distensão do útero de forma que toda a sua superfície entre em contato com a solução. Éguas primíparas normalmente necessitam de apenas 1 litro de solução, enquanto éguas com um ou mais partos, pode ser necessária a utilização de 2 litros. A infusão da solução é repetida até que o líquido retorne limpo do útero (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016).

2.4.4 Anti-inflamatórios

Os glicocorticoides têm sido usados como imunomoduladores no tratamento de éguas susceptíveis a endometrite (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016). Podem ser utilizados em éguas com endometrite persistente pós cobertura, com o objetivo de reduzir a migração de neutrófilos para o útero (SCOGGIN, 2016).

A administração intravenosa de 50 mg de dexametasona 1h antes da IA em combinação com os tratamentos tradicionais (drogas ecbólicas e lavagem uterina) reduz a endometrite pós-cobertura em éguas susceptíveis. Recomenda-se uma segunda aplicação de dexametasona depois da ovulação caso a égua apresente excesso de LIU 24h após a IA (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016). Caso o glicocorticoide de escolha seja a prednisolona, deve-se começar a aplicação 2 dias antes da IA, na dose de 0,1mg/kg pela via oral BID (SCOGGIN, 2016).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) também são opções para o tratamento de endometrite em éguas, principalmente na endometrite persistente pós cobertura, sendo o firocoxib o mais empregado. Este medicamento é um AINE seletivo para a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), apresenta uma boa ação no útero e não interfere na ovulação (FRISO et al., 2019).

2.4.5 Tratamentos e substâncias alternativas

As terapias não tradicionais têm ganhado espaço na reprodução equina visto que diversos casos de endometrites apresentam-se refratários a terapêutica convencional. Nesses casos, as terapias alternativas podem ser utilizadas sozinhas ou em associação com a terapêutica convencional. É importante ressaltar que as medicações incluídas neste tópico são aquelas muitas vezes utilizadas “off-label” e acompanhadas por evidências plausíveis de seus resultados farmacológicos (SCOGGIN, 2016).

Diferentes agentes com capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora vêm sendo pesquisados, entre eles podemos citar o plasma rico em plaquetas para a redução de inflamação (REGHINI et al., 2015) e o extrato de parede celular do *Mycobacterium sp* como agente imunomodulador uterino (FUMUSO et al., 2007).

O dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado na concentração de 10 a 20% pode diminuir a inflamação atuando na redução de radicais livres (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016). *In vitro*, o DMSO na concentração entre 10-20% demonstrou efeito citotóxico sobre a *Cândida albicans*, e, em concentrações maiores que 30% inibiu o seu crescimento (WONG; DAVIS; WHITE, 2001). No entanto, se aplicado em altas concentrações pode causar irritação no endométrio, perda de células e ulceração do epitélio (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016; WONG; DAVIS; WHITE, 2001).

Em casos com a suspeita ou diagnóstico de biofilme, pode-se empregar a N-acetilcisteína na concentração de 5 a 10%. Acredita-se que este medicamento tenha a capacidade de quebrar a matriz extracelular formada pelos microrganismos, favorecendo a eliminação da infecção (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016).

Agentes quelantes, como o Tris-EDTA, podem ser capazes de interferir nos cátions presentes da membrana celular dos fungos, resultando em alterações na sua integridade. Dessa forma, ele possui a capacidade de potencializar o efeito dos antifúngicos e reduzir o aparecimento de resistência, podendo então, ser empregado como auxiliar no tratamento de endometrites fúngicas (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016).

No contexto de tratamentos alternativos para a endometrite, a ozonioterapia têm demonstrado grande potencial como agente antimicrobiano e também com capacidade anti-inflamatória (ÁVILA et al., 2022). Esta terapia foi recentemente reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) pela resolução 1.364 de 22 outubro de 2020, que

regulariza a técnica como privativa do Médico Veterinário e permite que seja utilizada de forma isolada, adjuvante ou complementar - sempre respeitando dose e vias recomendadas - no tratamento das enfermidades dos animais.

2.5 Ozonioterapia

2.5.1 Bioquímica do ozônio

O ozônio é um gás formado por três átomos de oxigênio, naturalmente encontrado na atmosfera; ele pode se formar quando o ar entra em contato com a luz ultravioleta ou quando ocorrem descargas elétricas - relâmpagos (BHATT; BHAT; DHAMA, 2016). É um oxidante mais potente do que o oxigênio, instável em altas concentrações e apresenta meia vida de aproximadamente 40 minutos a 20° C (MERHI et al., 2019). Para o uso medicinal, apresenta-se em uma mistura de 95 a 99% de oxigênio com 1 a 5% de ozônio, obtido de máquinas que transformam oxigênio medicinal em ozônio medicinal (SCIORSCI et al., 2020).

Por ser uma molécula altamente reativa e instável, o ozônio possui atividade contra bactérias, fungos, vírus e protozoários *in vitro* (BHATT; BHAT; DHAMA, 2016; MERHI et al., 2019), apresentando também ação analgésica (BIAZZO; CORRIERO; CONFALONIERI, 2018; PAOLONI et al., 2009) e de modulação do sistema imune (XING et al., 2015). O ozônio é capaz de oxigenar as células do organismo e aumentar a estabilidade de membrana das células saudáveis (ALVES et al., 2004; BHATT; BHAT; DHAMA, 2016; RESITOGU et al., 2018).

As reações entre o ozônio e as moléculas orgânicas acontecem em uma certa ordem de preferência: primeiramente reage com os lipídeos da membrana celular, proteínas e depois com os antioxidantes (como ácido ascórbico e a glutatona). Os produtos dessa reação são as espécies reativas de oxigênio (ROS – principalmente o peróxido de hidrogênio) e produtos da oxidação lipídica (LOP) que atuam como segundos mensageiros do ozônio em locais distantes da sua aplicação (BHATT; BHAT; DHAMA, 2016; HERNANDEZ; MENÉNDEZ; WONG, 1995; PRIOR; SQUADRITO; FRIEDMAN, 1995). Dessa forma o ozônio é capaz de criar um estresse oxidativo controlado que estimula a atividade de processos biológicos e a expressão de genes responsáveis por produzir proteínas e enzimas antioxidantes, entre elas podemos citar a catalase, superóxido dismutase e a glutatona peroxidase (ÁVILA et al., 2022; MERHI et al., 2019; TSUZUKI et al., 2016).

2.5.2 Formas de aplicação

O ozônio pode ser administrado, tanto na sua forma gasosa quanto dissolvido em óleos e soluções como Ringer com Lactato ou fisiológica (NaCl 0,9%). Entre as suas diversas formas de administração encontram-se a auto-hemoterapia, insuflação retal e uterina, administração de soro intravenoso ozonizado, *bagging* e óleo ozonizado. Deve-se atentar ao fato de que a aplicação da mistura gasosa O₂-O₃ pode ser tóxica se realizada pela via respiratória (BHATT; BHAT; DHAMA, 2016; PRIOR; SQUADRITO; FRIEDMAN, 1995; SAGAI; BOCCI, 2011).

2.5.3 Testes *in vitro*

Por apresentar uma grande capacidade oxidante inespecífica, o ozônio é capaz de causar a degradação do DNA, danos na membrana plasmática de bactérias e na parede celular de fungos, representando assim uma possível alternativa para a utilização de antibacterianos e antifúngicos. Em relação a sua capacidade antiviral, atua oxidando o capsídeo e o material genético, impedindo a replicação do vírus (ÁVILA et al., 2022). A aplicação da mistura gasosa O₃-O₂ e do óleo ozonizado demonstrou capacidade de inibir o crescimento *in vitro* do oomiceto *Pythium insidiosum* isolado de cães (FERREIRA et al., 2021). A solução salina ozonizada (0,1mg/minuto) demonstrou capacidade de redução de 100% do número (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus*, tanto da sua forma planctônica (60 minutos de contato) quanto em biofilme (360 minutos) (AL-SAADY et al., 2016).

Ao avaliar o mecanismo pelo qual alguns desinfetantes atuam sobre a *E.coli in vitro*, CHO et al., 2010, demonstrou que devido ao seu alto potencial oxidante, o ozônio atua principalmente causando lesões na membrana celular. Ele reage com os componentes de membrana, evidenciado pela mudança de permeabilidade, liberação de proteínas e lipídeos, e somente quando esta barreira é danificada que consegue penetrar na célula e oxidar os demais componentes celulares. Portanto, a morte celular causada por essa molécula se deve principalmente aos danos na membrana celular. ARANA et al., 1999 observou o mesmo mecanismo de ação ao testar a desinfecção pelo ozônio sobre *E.coli* em resíduos de efluentes. Relatou que após a ozonização 95.5% das bactérias apresentavam alterações na sua permeabilidade de membrana. No entanto, se faz necessária a realização de estudos visando elucidar os mecanismos de ação envolvidos nos fenômenos bioquímicos que o ozônio possa apresentar *in vivo* contra as bactérias e fungos, em cada uma de suas formas e vias de aplicação.

2.5.4 Medicina humana

Existem relatos que a primeira utilização do ozônio foi em 1956 quando realizou-se a desinfecção de salas cirúrgicas e posteriormente, em 1960 para o tratamento de água (MERHI et al., 2019). No entanto, autores diferentes relatam que o ozônio tem sido utilizado desde 1800 no tratamento de diversas condições como infecções, queimaduras, acne, úlceras, feridas, doença periodontal, desordens ortopédicas, esclerose múltipla, diabetes mellitus entre outros. Além disso, o ozônio tem demonstrado bons resultados em enfermidades ginecológicas e obstétricas como, hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia, retenção de placenta, vaginite bacteriana e doença inflamatória pélvica (CALDERON et al., 2016b).

2.5.5 Medicina veterinária

O ozônio pode ser utilizado em diversos processos patológicos que acometem os animais, da mesma forma que em humanos. Em grandes animais mais comumente é aplicado no tratamento de feridas cutâneas e problemas reprodutivos (ÁVILA et al., 2022).

Alguns trabalhos, principalmente em ruminantes, avaliaram as possíveis aplicações da ozonioterapia na reprodução. Demonstrou-se que aplicação de ozônio na sua forma de spray aumenta a performance reprodutiva de vacas no pós parto, diminuindo o tempo entre um parto e a gestação subsequente (DJURICIC et al., 2012). Estes resultados também foram alcançados em outro estudo com a aplicação de 50 mL de solução destilada ozonizada (50 µg/mL) intrauterina em vacas com 35 dias pós parto, observando-se redução da prevalência de endometrites subclínicas e aumento da fertilidade (ESCANDÓN et al., 2020).

Em um estudo com 256 ovelhas que necessitaram de assistência ao parto ou que apresentaram retenção de placenta, comparou-se o uso de oxitetraciclina (em forma de tablets de uso intrauterino) e de ozônio na sua forma de spray. Verificou-se que os animais tratados com ozônio tiveram involução uterina igual ou superior em relação aos animais tratados com o antibacteriano (ĐURIČIĆ et al., 2016).

Na espécie equina, FERREIRA et al. (2021) observaram efeitos positivos da insuflação intrauterina com o gás ozônio, na concentração de 40 µg/mL, sobre a vascularização do endométrio. Outro estudo, comparou a capacidade anti-inflamatória e antibacteriana da mistura gasosa O₂-O₃ (40 µg/ml) e do óleo de girassol ozonizado intrauterino em éguas, demonstrando que as duas formas de aplicação foram efetivas para o tratamento de endometrites infecciosas

em éguas. Vale ressaltar que o gás apresentou maior eficácia tanto para reduzir a contaminação quanto a inflamação uterina (ÁVILA et al., 2022).

A literatura referente a aplicação do gás ozônio intrauterino em éguas ainda é relativamente escassa, se faz necessária a realização de mais estudos visando a avaliação da seguridade desta terapia em relação à possíveis lesões endometriais, com a presença de grupo controle com a insuflação de oxigênio, visando isolar apenas os efeitos do ozônio e, aplicação de métodos menos subjetivos de comparação de resultados histológicos, utilizando-se a histomorfometria.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da insuflação uterina com mistura gasosa oxigênio-ozônio e do oxigênio sobre endométrio de éguas saudáveis e de éguas diagnosticadas com endometrite.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos da insuflação uterina com mistura gasosa oxigênio-ozônio sobre o endométrio de éguas saudáveis e diagnosticadas com endometrite mediante avaliação de citologia uterina;
- Verificar o efeito da insuflação uterina com a mistura gasosa oxigênio-ozônio mediante a avaliação histopatológica endometrial;
- Avaliar e comparar a arquitetura endometrial (vascularização, proliferação glandular e fibrose) antes e após a insuflação uterina com mistura gasosa oxigênio-ozônio e o gás oxigênio por meio de histomorfometria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV

Essa pesquisa foi submetida à apreciação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV) e aprovada conforme protocolo 32/2021 (anexo 2). Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados pela médica veterinária Rachel Tavares (CRMV-MG 18.592) e supervisionados pela docente Bruna Waddington de Freitas (CRMV-MG 10.105).

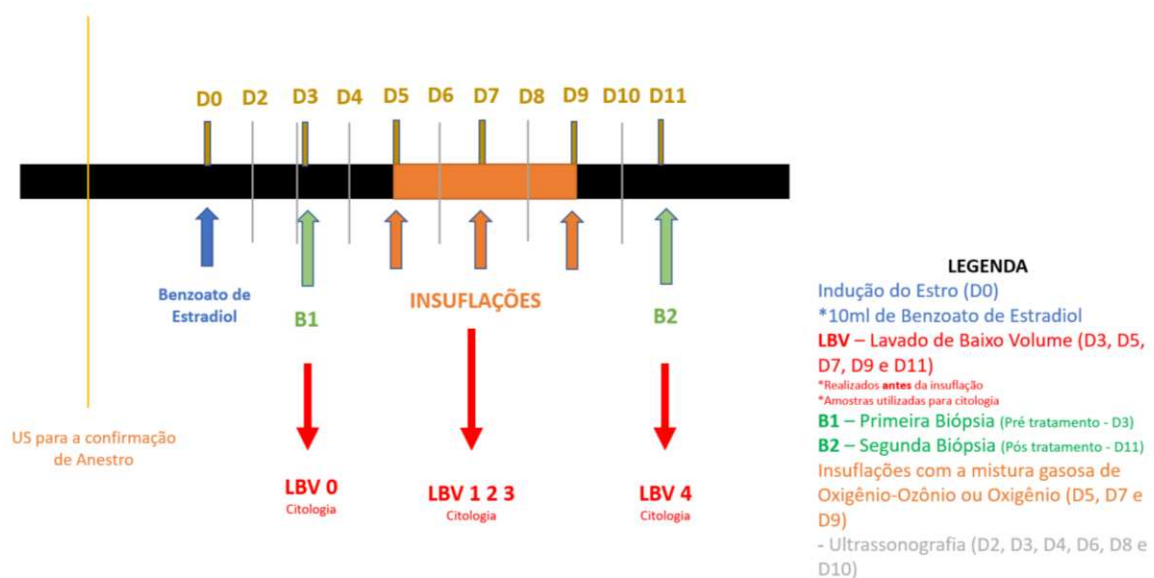
4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Experimento 1

4.2.1.1 Local e período experimental

O experimento foi conduzido no Haras Bavária, localizado em Visconde do Rio Branco - Minas Gerais (-21.101152 -42.835585) e, o processamento das amostras e análises dos dados foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal (LABRAN - DVT), no Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC - DVT), no Laboratório de Reprodução Animal e Toxicologia (LARAT - DBG) e no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária (LPPCV - DVT), localizados no campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa, no estado de Minas Gerais. A coleta de amostras (Figura 1) foi realizada entre os dias 31 de julho e 12 de agosto de 2021 e o processamento das mesmas se estendeu até abril do ano seguinte.

Figura 1 - Esquema representativo da metodologia aplicada ao experimento 1



Fonte: autoria própria.

4.2.1.2 Animais

Foram utilizadas éguas receptoras de embriões da raça Mangalarga Marchador que se encontravam sob a condição de anestro sazonal (GINTHER, 1990). A idade dos animais variou entre 3 e 22 anos, o peso de 300 a 400 Kg, e escore corporal entre 5 e 6, numa escala de 1 a 9 conforme Henneke et al. (1983). Todas as éguas permaneceram em regime extensivo durante o período experimental, alocadas em piquetes de coast cross e tifton e recebiam 2 Kg de ração adequada à categoria e 2 Kg de silagem de milho uma vez ao dia, sendo suplementadas com sal mineral e água de qualidade *ad libitum*. O manejo sanitário foi realizado conforme rotina do haras, com desvermifugação e vacinação específicos para a categoria animal.

4.2.1.3 Grupos experimentais

Para determinar os grupos experimentais, foram levados em consideração o histórico reprodutivo das éguas, a avaliação prévia mediante exame ginecológico completo e avaliação da citologia endometrial. Das 13 éguas avaliadas, 11 éguas foram consideradas portadoras de endometrite, apresentando citologia com contagem superior a 1 PMN/campo, conforme Ferris et al. (2015). Foi então realizada a distribuição aleatória desses animais (n=13) em:

- Grupo Controle (GC; n=3): insuflação uterina com 1 L de oxigênio na vazão de 1/4 de litro por minuto, até a distensão completa do útero;
- Grupo Tratado (GT; n=10): insuflação uterina com 1 L de ozônio na concentração de 44 µg/mL na vazão de 1/4 de litro por minuto, até a distensão completa do útero;

A aplicação do benzoato de estradiol (BE; 10 mL, via IM) foi considerada dia 0 (D0), início do protocolo. A primeira biópsia uterina (B1) foi realizada três dias após a aplicação do BE (D3) e a segunda (B2) dois dias após o término do protocolo (D11).

As insuflações uterinas foram realizadas no D5, D7 e D9, preconizando um intervalo de 48h entre as aplicações. Todas as insuflações foram precedidas de um LBV, visando a obtenção de dados referentes a citologia em entre as aplicações. O último LBV (4) foi realizado dois dias após a última insuflação (D11), visando a coleta das informações após o término do protocolo (Figura 1).

4.2.2 Experimento 2

4.2.2.1 Local e período experimental

O experimento foi conduzido no setor de Equideocultura da Universidade Federal de Viçosa campus Florestal (-19.884426 -44.417829) e, o processamento das amostras e análises dos dados foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal (LABRAN - DVT), no Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC - DVT), no Laboratório de Reprodução Animal e Toxicologia (LARAT - DBG) e no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária (LPPCV - DVT), localizados no campus Viçosa da Universidade Federal de Viçosa, no estado de Minas Gerais. A coleta de amostras (esquema 2) foi realizada entre os dias 11 de novembro e 18 de dezembro de 2021 e o processamento das mesmas se estendeu até abril do ano seguinte.

4.2.2.2 Animais

Foram acompanhados 2 ciclos estrais de éguas de diferentes raças (Bretão, Mangalarga Marchador e Crioulo), entre receptoras e matrizes. A idade dos animais variou entre 3 e 22 anos e o peso de 300 a 500Kg, com escore corporal entre 5 e 6, numa escala de 1 a 9 conforme Henneke et al. (1983). Todas as éguas permaneceram em regime extensivo, alocadas em piquetes de coast cross e tifton e receberam 2Kg de ração adequada à categoria, uma vez ao dia, e suplementadas com sal mineral e água de qualidade *ad libitum*. O manejo sanitário foi realizado conforme rotina do setor, com desvermifugação e vacinação de acordo com o recomendado para a categoria animal.

4.2.2.3 Grupos experimentais

Para determinação dos grupos experimentais, foram levados em consideração o histórico reprodutivo das éguas, a avaliação prévia mediante exame ginecológico e avaliação da citologia endometrial. No primeiro ciclo avaliado, as éguas foram submetidas à avaliação ultrassonográfica modo B a cada 48h e, mediante a detecção de folículo com diâmetro superior a 30 mm e edema uterino 3, considerando uma escala de 1 a 4, foi realizado primeiro LBV visando a coleta de amostras para a citologia. De acordo com os resultados do exame ginecológico (RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007), os animais foram distribuídos nas duas categorias a seguir:

- Éguas sem endometrite (n=6): éguas com contagem de até 1 PMN/campo.
- Éguas com endometrite (n=13): éguas com contagem de superior a 1 PMN/campo.

Determinadas as categorias (éguas com x sem endometrite), foi então realizada a distribuição aleatória desses animais nos seguintes grupos experimentais:

- Éguas sem endometrite (n=6):

Controle Negativo (GC-; n=3): insuflação uterina com 1 L de oxigênio na vazão de 1/4 de litro por minuto, até a distensão completa do útero;

Controle Positivo (GC+; n=3): insuflação uterina com 1 L de ozônio na concentração de 44 µg/mL na vazão de 1/4 de litro por minuto, até a distensão completa do útero;

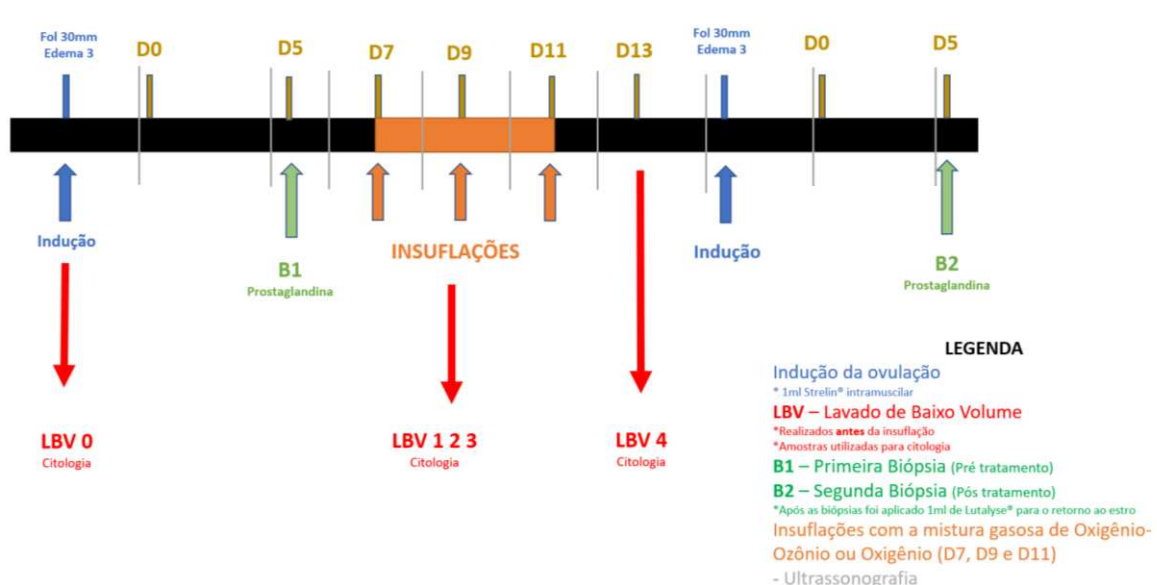
- Éguas com endometrite (n=13):

Endometrite Controle (GEC; n=6): insuflação uterina com 1 L de oxigênio na vazão de 1/4 de litro por minuto, até a distensão completa do útero;

Endometrite Tratada (GEBT; n=7): insuflação uterina com 1 L de ozônio na concentração de 44 µg/mL na vazão de 1/4 de litro por minuto, até a distensão completa do útero;

No segundo ciclo acompanhado, no quinto dia após a detecção da ovulação (D5), foi realizada a primeira biópsia (B1) e a aplicação de 1 mL de Lutalyse®. Dois dias após, no D7, iniciou-se a aplicação de oxigênio ou da mistura gasosa oxigênio-ozônio, sendo sempre precedida por um LBV. Este procedimento foi realizado três vezes com um intervalo de 48h entre eles, nos dias D7, D9 e D11 (Figura 2). O último LBV (4) foi realizado no D13 para a coleta das amostras finais da citologia. Após o final do protocolo, as éguas foram acompanhadas via ultrassonografia (modo B) para a detecção de folículo com diâmetro superior a 30 mm e edema uterino 3 e então a ovulação foi induzida com 1ml de Strelin®. A última biópsia uterina foi realizada no D5 do terceiro ciclo avaliado (Figura 2).

Figura 2 - Esquema representativo da metodologia aplicada ao experimento 2



Fonte: autoria própria.

4.3 Avaliação dos animais

4.3.1 Identificação e anamnese

As éguas foram identificadas individualmente pelo nome, marcações numéricas, pelagem e características fenotípicas. A idade foi consultada em registros ou estimada pela cronologia dentária. O histórico, tanto clínico quanto reprodutivo, foi obtido a partir de fichas e registros do haras, assim como via anamnese com os cuidadores e veterinários responsáveis pelos

animais. As informações foram anotadas na ficha reprodutiva individual de cada animal (anexo 3).

4.3.2 Escore de condição corporal

O escore de condição corporal dos animais foi classificado, conforme Henneke et al. (1983). Os animais estimados na categoria 1 foram aqueles extremamente magros e sem nenhuma deposição de gordura, enquanto os animais na categoria 9 foram aqueles com excesso de deposição de gordura corporal. Essa classificação foi realizada observando-se e palpando pontos de deposição de gordura no corpo: inserção da cauda; processos espinhosos lombares; borda dorsal do pescoço; cernelha; região caudal da escápula; costelas. O valor final foi obtido pela soma aritmética das duas avaliações e anotado na respectiva ficha reprodutiva (anexo 3).

4.4 Exame clínico reprodutivo

4.4.1 Palpação e ultrassonografia transretal

Todos os animais foram avaliados, antes de iniciar o experimento, via palpação transretal e ultrassonografia (Mindray Z50VET com transdutor linear transretal 75L50EAV) para avaliação da condição ginecológica.

Utilizando-se luvas de palpação devidamente lubrificadas, a ampola retal foi esvaziada e a palpação transretal do útero, ovários e cérvix realizada. Os dados obtidos foram anotados em ficha individual (anexo 3) contendo: 1. Tônus uterino 2. Tônus cervical 3. Posição do útero (penduloso ou não). O tônus uterino e cervical em éguas não gestantes é máximo durante o diestro, sendo então classificadas com tônus 2 e mínimo durante o anestro, classificadas com tônus 0. Por fim, durante o estro estas estruturas encontram-se com um tônus intermediário, sendo classificado como 1 (GRIFFIN; GINTHER, 1991).

A ultrassonografia transretal foi realizada para avaliação do estágio do ciclo estral a partir das dimensões foliculares, presença ou ausência de corpo lúteo nos ovários e nível de edema endometrial, além da avaliação de acúmulo ou não de líquido intrauterino, presença ou não de vesícula embrionária e outras condições específicas (folículos hemorrágicos, cistos uterinos, entre outros) (GINTHER et al., 2004; GINTHER; PIERSON, 1984).

4.4.2 Exame da cérvix

A palpação digital da cérvix foi realizada juntamente com a primeira coleta do lavado de baixo volume (LBV 0), durante o exame ginecológico. Vagina e cérvix foram avaliadas durante a passagem da sonda tipo bivona para o procedimento e as alterações anotadas na ficha reprodutiva individual (anexo 3).

4.5 Coleta de amostras

Previamente à cada coleta de amostras uterinas, foi realizada a higienização de períneo. Para tanto, a cauda da égua, contida em tronco, foi isolada com capa própria. A vulva e região perineal foram cuidadosamente lavadas com água corrente e solução clorexidina degermante 2%. Posteriormente, a região higienizada foi seca com papel toalha descartável.

4.5.1 Lavado uterino de baixo volume

O LBV foi realizado mediante uso de sonda uterina do tipo bivona estéril para obtenção de amostra de conteúdo endometrial para avaliação citológica. A sonda foi posicionada dentro do útero via transcervical, o cuff inflado com 60 mL de ar, e 250 mL de solução salina (NaCl 0,9%) foi infundido no lúmen uterino. O útero foi então massageado via palpação transretal por 2 minutos e o líquido retirado por sifonagem para dentro do mesmo frasco. O material recolhido foi acondicionado em um tubo falcon estéril de 15ml e centrifugado a 600 x g por 10 minutos.

4.5.2 Biópsia uterina

As amostras para biópsia foram coletadas via transcervical, com o auxílio de pinça de biópsia uterina adequada para a espécie, previamente esterilizada. A retirada dos fragmentos se deu próximo à região bifurcação uterina (LINTON; SERTICH, 2016) e então acondicionados em frascos com a solução fixadora, Bouin, na proporção mínima de 20 partes da solução para 1 de tecido. As amostras permaneceram na solução por 24h que foi então substituída por etanol 70%.

4.6 Exames laboratoriais

4.6.1 Citologia

Após a centrifugação do conteúdo obtido do LBV, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado recuperado com o auxílio de escova cervical. Realizou-se então o rolamento da escova sobre lâmina de microscopia seguida por secagem no ambiente. As amostras foram coradas com Kit Panótico Rápido e destinadas à análise, realizada por microscopia de luz em aumento de 1000x sob imersão em óleo. Foram contabilizados os neutrófilos em 10 campos com células endometriais e os achados classificados conforme Ferris et al. (2015): normal: 0-raros

neutrófilos/campo; inflamação leve: 1-2 neutrófilos/campo; inflamação moderada: 3-5 neutrófilos/campo e inflamação severa: >5 neutrófilos/campo.

4.6.2 Histopatologia

4.6.2.1 Inclusão de amostras na parafina

A confecção das lâminas histológicas do experimento 1 foi iniciada com a desidratação dos espécimes em imersões crescentes em etanol, 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto, sendo cada procedimento com tempo de contato de 60 minutos. Após a imersão em álcool absoluto, as amostras foram colocadas em solução álcool-xilol e depois em xilol I, II e III, sendo cada procedimento com duração de 1 hora. As amostras foram então embebidas em parafina e cortes histológicos de 5 µm obtidos em micrótomo rotativo (Multicut 2045, Reichert-Jung, Germany). A coloração de escolha para a avaliação histopatológica e morfometria foi hematoxilina e eosina.

4.6.2.2 Inclusão de mostras na resina

A confecção das lâminas histológicas do experimento 2 foi iniciada com o corte das amostras em tamanho adequado para a sua inclusão na resina. O processo seguiu com a desidratação dos espécimes em imersões crescentes em etanol, 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto, sendo cada procedimento com tempo de contato de 30 minutos. As amostras foram então embebidas em 2-hydroxyethyl methacrylate (Historesin®, Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) e cortes histológicos de 3 µm foram obtidos em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica, Nussloch, Alemanha). A coloração de escolha para a avaliação histopatológica e morfometria foi a hematoxilina-eosina .

4.6.2.3 Avaliação histopatológica

Foram avaliadas e semi quantificadas as células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e histiócitos), edema, hemorragia, necrose e alterações glandulares - conforme Kenney e Doing (1986). A presença de células inflamatórias no estrato compacto endometrial foi classificada da seguinte forma: escore 0, sem presença de células; escore 1, presença de poucas células; escore 2, número moderado de células;(escore 3, abundância de células. Éguas classificadas com o escore 0 foram consideradas sem endometrite (DIEL DE AMORIM et al., 2016).

O edema foi observado na lâmina própria do endométrio, nos animais positivos constatou-se o estroma menos denso e mais claro, com glândulas endometriais dispersas (VAN CAMP, 1988). O escore de edema foi classificado da seguinte forma: (escore 0) não foi observada a

presença de edema; (escore 1) presença de edema leve; (escore 2) edema moderado; (escore 3) edema acentuado.

Necrose glandular foi caracterizada pela perda de arquitetura glandular e basofilia citoplasmática (KATILA, 1988). Por fim, a hemorragia foi identificada pela presença de hemácias ou siderófilos (macrófagos contendo hemossiderina – produto da degradação das hemácias) no estrato esponjoso endometrial (SNIDER; SEPOY; HOLYOAK, 2011).

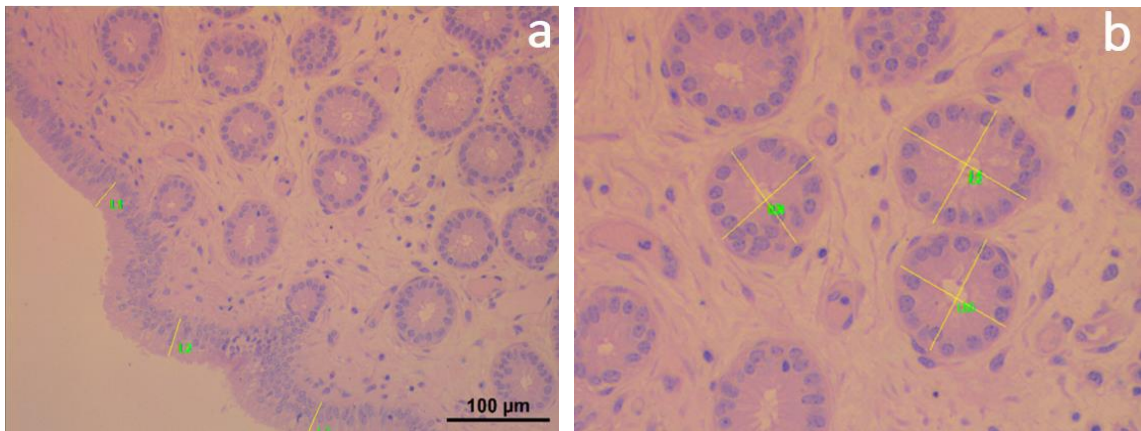
4.6.3 Histomorfometria

Imagens digitais do endométrio foram obtidas utilizando microscópio de luz (Olympus BX-53, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital (Olympus DP73, Tóquio, Japão) e analisadas com os programas Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) e Java-based image processing program (ImageJ, NIH).

Dez campos de cada amostra foram aleatoriamente selecionados e fotografados. Os aspectos foram avaliados conforme Caballeros et al. (2019); Ferreira et al. (2021); Camozzato et al. (2019); Herrera et al. (2018); Brasil et al. (2005) e Silva et al. (2019):

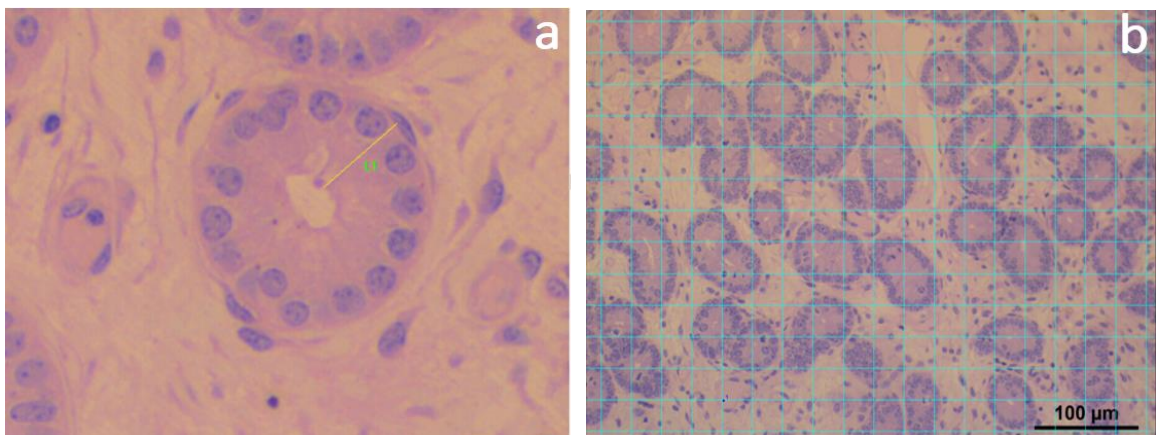
- a. Altura do epitélio luminal: mensuração desde a membrana basal até a membrana apical das células luminiais. De cada amostra, foram selecionados 10 campos, em aumento de 20 x, sendo realizadas 3 mensurações em cada campo (Imagem 3).
- b. Altura do epitélio glandular: mensuração desde a membrana basal até a membrana apical das células glandulares. De cada amostra, foram selecionados 10 campos, em aumento de 20 x, sendo realizadas 3 mensurações em cada campo (Imagem 4).
- c. Diâmetro glandular: mensuração de dois diâmetros (membrana basal de uma célula glandular até a membrana basal de outra célula), formando um ângulo reto entre as duas mensurações. Realizado em 10 campos, em aumento de 20 x, sendo que em cada campo, 3 glândulas esféricas foram mensuradas (Imagem 3).
- d. Densidade volumétrica: uma grade contendo 266 pontos foi colocada sobre a imagem e a contagem diferencial de cada estrutura foi realizada (vasos sanguíneos, epitélio glandular, lúmen glandular e tecido conjuntivo; Imagem 4).

Imagem 3 – Mensuração (a) da altura do epitélio luminal (L1, L2, L3) e (b) do diâmetro glandular (linhas em amarelo). – Imagem em aumento de 20 x.



Fonte: autoria própria.

Imagem 4 – Mensuração (a) da altura do epitélio glandular (L1) e da densidade volumétrica (b) - 100 µm - aumento de 20x



Fonte: autoria própria.

4.7 Insuflação uterina

Após a realização dos LBV, as éguas foram submetidas à insuflação uterina com gás oxigênio (O₂) ou a mistura oxigênio-ozônio (O₃), conforme grupo experimental. Para tal, foi posicionado no corpo do útero, via transcervical, uma sonda uterina tipo bivona com cuff, esterilizada e conectada à máquina geradora de ozônio (ZVET 220V®, OzoneBras) por mangueira de silicone atóxica. A taxa de insuflação foi de ¼ de litro por minuto, na potência média da máquina, gerando uma concentração de 44 µg/L de O₃ nas éguas do grupo tratado ou na concentração de 100% de O₂ nas éguas do grupo controle. Após a constatação da distensão

completa do útero, a máquina era desligada, o cuff esvaziado e a sonda retirada cuidadosamente. Ao final da insuflação, as éguas receberam 10 UI de ocitocina pela via intramuscular.

4.8 Análises estatísticas

Para análise dos dados, foi utilizado o *Statistical Analysis System* (SAS OnDemand). As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Bartlett e de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da homogeneidade de variâncias e normalidade dos erros, respectivamente. Os dados que não atenderam essas premissas foram submetidos a transformações estatísticas. Os dados foram analisados em medidas repetidas no tempo (*Mixed Procedure*) seguindo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + (TD)_{ij} + e_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} , resposta; μ , constante; T_i , efeito do tratamento; D_j , efeito do tempo (dia); $(TD)_{ij}$, interação; e e_{ijk} , erro aleatório.

O fator de medidas repetidas foi o dia em cada nível de animal (*subject*), a matriz de covariância de estrutura autorregressiva (*AR(1)*) foi usada. As médias (*LS-means*) foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer (LITTELL et al., 2006).

5 RESULTADOS

Nenhum dos animais tratados apresentou quaisquer reações adversas à administração do ozônio durante o período experimental. Algumas éguas ficaram inquietas durante a insuflação, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, provavelmente devido à distensão uterina causada pelo gás durante o procedimento.

5.1 Experimento 1

5.1.1 Identificação, anamnese e histórico reprodutivo

Nenhuma das éguas possuía histórico reprodutivo ou exame ginecológico completo, incluindo as avaliações laboratoriais. Durante a anamnese constatou-se que todas as éguas (13) eram utilizadas como receptoras de embriões e que, de acordo com o médico veterinário responsável, seis apresentaram dificuldade para gestar.

5.1.2 Exame clínico reprodutivo

No decorrer do exame externo da genitália, observou-se que uma das receptoras apresentava laceração grave de vulva, com perda do cooptação dos lábios vulvares. Outras três éguas apresentaram má conformação de períneo, ânus deslocado cranialmente e/ou vulva horizontal.

Durante a palpação digital da cérvix constatou-se que duas éguas apresentavam alterações cervicais, uma com cérvix tortuosa e outra com áreas de fibrose.

5.1.3 Citologia

Não foi observada diferença entre as médias das citologias dos grupos experimentais e os tempos de coleta ($p > 0,05$; tabela 1).

Tabela 01. Média e erro padrão da contagem de polimorfonucleados por campo x tempo de coleta x grupo experimental e distribuição do número de éguas conforme classificação para endometrite

Grupo experimental	Tempo	Média	Erro Padrão	Classificação			
				Normal (0 – 1)	Leve (1-2)	Moderada (3-5)	Severa (>5)
O2	1	5,66	2,39	0	1	0	2
	2	1,46	1,06	1	1	1	0
	3	5,10	4,90	2	0	0	1
	4	8,40	4,75	0	0	2	1
O3	1	6,16	2,24	2	1	3	3
	2	1,32	0,63	6	2	0	1
	3	2,82	1,62	6	0	1	2
	4	3,77	1,38	3	2	1	3

Tempo: momentos da coleta do LBV para avaliação citológica de acordo com o descrito na Figura 1.

Classificação: normal: 0-raros neutrófilos/campo; inflamação leve: 1-2 neutrófilos/campo; inflamação moderada: 3-5 neutrófilos/campo e inflamação severa: >5 neutrófilos/campo. Adaptado de FERRIS, 2016.

$P > 0,05$.

5.1.4 Histopatologia

A avaliação histopatológica demonstrou que nenhuma das éguas, independentemente do tratamento, apresentava alteração glandular nos tempos avaliados. Todas as éguas apresentaram edema endometrial, antes após as insuflações uterinas e demonstraram redução no grau de edema após a insuflação uterina, independente do grupo experimental. Três éguas apresentaram áreas de necrose ao início do experimento, sendo que ao final, a frequência se manteve. Onze éguas apresentaram hemorragia endometrial, padrão que se manteve similar nos dois tempos avaliados no grupo controle e, no grupo tratamento, foi observada redução de 20% de animais com esta alteração (tabela 4).

Tabela 04. Distribuição de frequências relativa às áreas de edema, necrose e hemorragia presentes no endométrio das éguas avaliadas pela histopatologia antes (tempo 1) e após (tempo 2) as insuflações uterinas.

Variável	Grupo experimental	Tempo	Escore			
			0	1	2	3
Edema	O2	1	0	0	100,00	0
		2	0	33,33	66,67	0
	O3	1	0	30,00	50,00	20,00
		2	0	70,00	30,00	0
Necrose	O2	1	66,67	0	33,33	0
		2	66,67	33,33	0	0
	O3	1	80,00	20,00	0	0
		2	90,00	10,00	0	0
Hemorragia	O2	1	0	66,67	33,33	0
		2	0	66,67	33,33	0
	O3	1	0	70,00	30,00	0
		2	20,00	70,00	10,00	0

O escore de edema, necrose e hemorragia: (escore 0) não foi observada a presença destes achados; (escore 1) leve; (escore 2) moderado; (escore 3) acentuado.
 $P > 0,05$.

O infiltrado inflamatório avaliado na histopatologia foi diferenciado em neutrofílico e linfocitário. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais assim como nos tempos observados com relação a presença de células inflamatórias endometriais avaliadas pela histopatologia ($P > 0,05$; Tabela 5).

Tabela 05. Distribuição de frequências relativa à presença de infiltrado inflamatório neutrofílico e linfocitário endometrial das éguas avaliadas pela histopatologia antes (tempo 1) e após (tempo 2) as insuflações uterinas.

Variável	Grupo experimental	Tempo	Escore			
			0	1	2	3
Neutrófilos	O2	1	66,67	0	33,33	0
		2	66,67	0	33,33	0
	O3	1	50,00	50,00	0	0
		2	70,00	30,00	0	0

Linfócitos	O2	1	33,33	33,33	33,33	0
		2	0	66,67	33,33	0
	O3	1	50,00	40,00	10,00	0
		2	20,00	50,00	30,00	0

O escore de infiltrado inflamatório: (escore 0) não foi observada a presença de infiltrado; (escore 1) leve; (escore 2) moderado; (escore 3) acentuado.

$P > 0,05$.

5.1.5 Histomorfometria

A avaliação pela histomorfometria demonstrou que no tempo 1 o grupo controle apresentava 28,62% do tecido endometrial constituído por glândulas endometriais e no tempo 2 detinha 43,70%. Quanto ao grupo tratado, no tempo 1 possuía 38,17% de tecido endometrial e no tempo 2 aproximadamente 51,61%. Não foi observada diferença entre os tratamentos e tempos em relação à densidade do epitélio glandular ($p > 0,05$; tabela 6; gráfico1). Com relação à densidade dos vasos sanguíneos dos grupos experimentais, não foi detectada diferença entre os tratamentos e os tempos avaliados ($p > 0,05$; tabela 6; gráfico1). Da mesma forma que a densidade de lúmens glandulares e tecido conjuntivo encontradas, tanto no tempo 1 quanto no tempo 2, não apresentou diferença após o tratamento ($p > 0,05$; tabela 6; gráfico1).

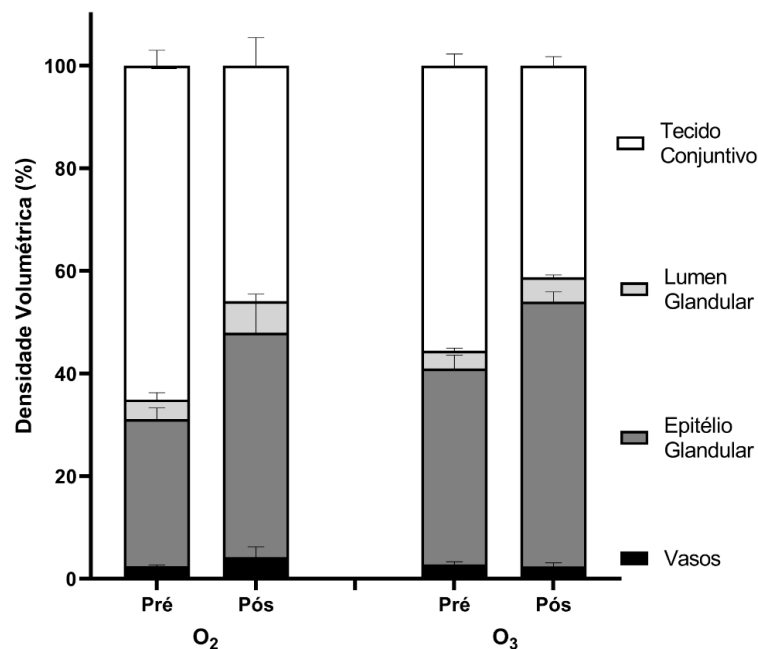
Tabela 6. Média e erro padrão da densidade volumétrica do epitélio glandular, vasos sanguíneos, lúmen glandular e tecido conjuntivo realizada através da histomorfometria antes (tempo 1) e após (tempo 2) as insuflações uterinas

Variável	Grupo experimental	Tempo	Média	Erro padrão
Epitélio Glandular	O2	1	28,62	2,17
		2	43,70	6,07
	O3	1	38,17	2,66
		2	51,61	1,87
Vasos Sanguíneos	O2	1	2,49	0,19
		2	4,19	2,04
	O3	1	2,77	0,56
		2	2,40	0,69
Lúmen Glandular	O2	1	3,78	1,37
		2	6,14	1,38

	O3	1	3,50	0,50
		2	4,71	0,47
Tecido Conjuntivo	O2	1	65,10	2,97
		2	45,91	5,49
	O3	1	55,55	2,28
		2	41,25	1,74

P>0,05.

Gráfico 1. Média e erro padrão da densidade volumétrica do epitélio glandular, vasos sanguíneos, lúmen glandular e tecido conjuntivo realizada através da histomorfometria pré (tempo 1) e pós (tempo 2) as insuflações uterinas



Fonte: Autoria própria

O valor médio referente à altura do epitélio luminal antes do tratamento foi de aproximadamente 16 μm , se mantendo semelhante ao final do experimento, não demonstrando diferença ao comparar os tratamentos e os tempos ($p>0,05$; Tabela 7). Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos e os tempos quando se avaliou a altura do epitélio glandular ($p>0,05$; tabela 7). Por fim, o diâmetro glandular também não apresentou diferença entre os tratamentos ($p>0,05$; tabela 7).

Tabela 7. Média e erro padrão da altura do epitélio luminal, do epitélio glandular e diâmetro glandular realizada através da histomorfometria antes (tempo 1) e após (tempo 2) as insuflações uterinas.

Variável	Grupo experimental	Tempo	Média (µm)	Erro padrão
Altura do Epitélio Luminal	O2	1	16,10	0,93
		2	16,18	1,43
	O3	1	15,97	0,87
		2	16,60	0,47
Altura do Epitélio Glandular	O2	1	12,38	0,86
		2	12,38	0,57
	O3	1	12,19	0,26
		2	13,41	0,31
Diâmetro Glandular	O2	1	39,00	0,82
		2	42,70	3,51
	O3	1	40,24	1,14
		2	45,29	0,85

P>0,05.

5.2 Experimento 2

5.2.1 Identificação, anamnese e histórico reprodutivo

Oito das éguas avaliadas eram utilizadas como matrizes. Durante a anamnese foi relatado que 2 delas apresentaram dificuldade para emprenhar, uma por várias estações seguidas e outra apenas na última estação. Outras 3 éguas, com aproximadamente 3,5 anos cada, entraram na primeira estação de monta (2021/2022). As outras 11 éguas eram utilizadas como receptoras de embrião, sendo que, durante a anamnese, foi relatado dificuldade em confirmar diagnóstico gestacional desses animais. No entanto, não foi possível obter histórico reprodutivo detalhado.

5.2.2 Exame clínico reprodutivo

Três éguas possuíam má conformação de períneo, com ânus deslocado cranialmente e/ou vulva horizontal. Outras duas éguas apresentavam útero penduloso à palpação transretal. Foram encontradas as seguintes alterações na avaliação ultrassonográfica: cistos uterinos em duas éguas, líquido intrauterino no diestro em uma égua e a presença de ar no útero em outras duas éguas. Por fim, na palpação digital da cérvix, constatou-se que uma das matrizes detinha uma fistula cervical, que terminava em um fundo de saco cego.

5.2.3 Citologia

A citologia realizada no tempo 1, previamente a primeira insuflação uterina, demonstrou que 66% das éguas do grupo controle apresentaram algum grau de inflamação uterina e no grupo tratamento 90% das éguas foram positivas. A avaliação no tempo 4, 48h após a última insuflação uterina, constatou que 33% das éguas do grupo controle continuaram apresentando inflamação endometrial, e no grupo tratamento, 40% delas continuaram classificadas com inflamação (tabela 9).

Tabela 9. Média e erro padrão da contagem de polimorfonucleados por campo x tempo de coleta x grupo experimental e distribuição do número de éguas conforme classificação para endometrite

Grupo experimental	Tempo	Média	Erro Padrão	Classificação			
				Normal (0 – raros)	Leve (1-2)	Moderada (3-5)	Severa (>5)
O2	1	4,75	1,56	2	3	1	3
	2	6,04	3,17	3	3	0	3
	3	2,46	1,79	5	2	1	1
	4	1,61	0,81	6	1	1	1
O3	1	6,00	1,80	1	3	2	4
	2	6,84	2,91	2	3	1	4
	3	1,50	0,67	7	1	1	1
	4	1,55	0,73	6	2	1	1

Tempo: momentos da coleta do LBV para avaliação citológica de acordo com o descrito na Figura 2.

Classificação: normal: 0-raros neutrófilos/campo; inflamação leve: 1-2 neutrófilos/campo; inflamação moderada: 3-5 neutrófilos/campo e inflamação severa: >5 neutrófilos/campo. Adaptado de FERRIS, 2016.

P<0,05.

Observou-se diferença ($p<0,05$) ao realizar a comparação entre os grupos experimentais, tratamentos e os tempos (tabela 10). As éguas sem endometrite demonstraram capacidade de controlar a inflamação de forma semelhante, tanto no grupo tratamento quanto no controle. No entanto, as éguas com endometrite, mas grupo controle, apresentaram dificuldade para reduzir a inflamação em comparação as éguas tratadas com ozônio.

Tabela 10. Média e erro padrão da contagem de polimorfonucleados por campo, nos diferentes tempos de coleta e a divisão entre éguas e com e sem endometrite dentro de cada grupo experimental.

Grupo experimental	Grupo experimental	Tempo	Média	Erro Padrão
Endometrite	O2	1	3,08	0,96
		2	9,90	5,26
		3	4,06	3,17
		4	2,50	1,39
	O3	1	6,88	2,11
		2	2,90	0,81
		3	1,46	0,83
		4	1,78	0,90
Sem Endometrite	O2	1	6,85	3,24
		2	1,22	0,60
		3	0,47	0,33
		4	0,50	0,16
	O3	1	2,45	2,35
		2	22,60	7,40
		3	1,65	1,15
		4	0,60	0,50

Tempo: momentos da coleta do LBV para avaliação citológica de acordo com o descrito na Figura 2.

P<0,05.

5.2.4 Histopatologia

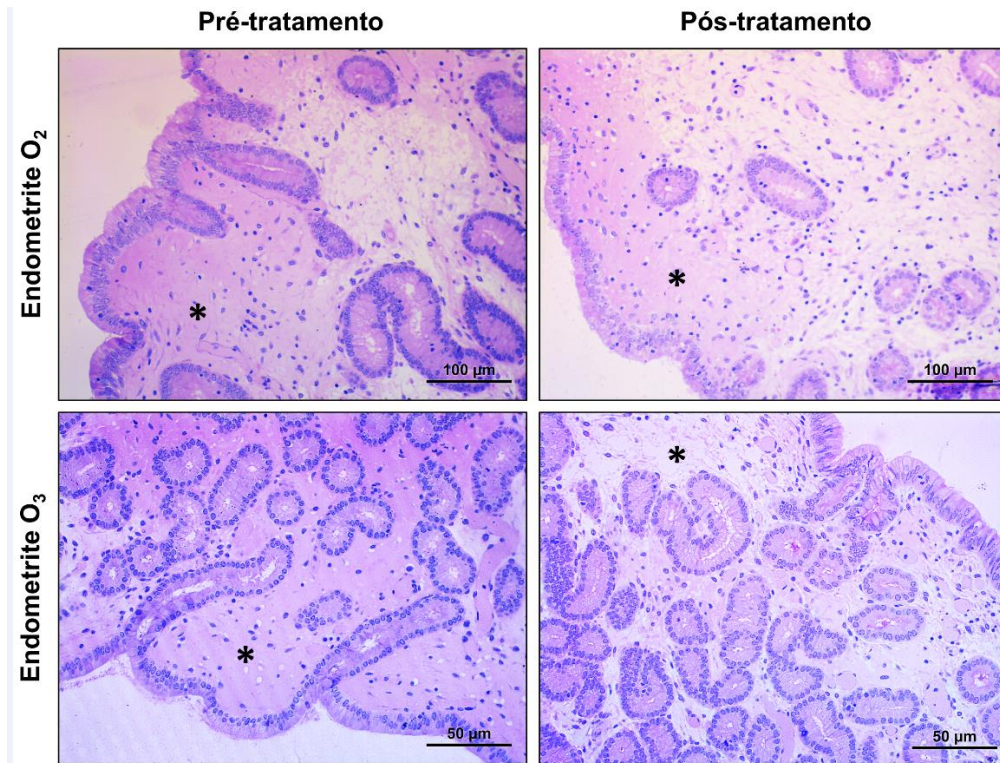
A avaliação histopatológica detectou a presença de cinco éguas no grupo controle com grau 1 de edema no tempo 1, padrão semelhante observado no tempo 2. No grupo tratamento foram observados sete animais (70%) com edema endometrial antes do início das insuflações e, na biópsia ao final do experimento, foi observada redução de 20% no diagnóstico dessa alteração associado a diminuição na gravidade dos achados. Avaliando-se a presença de necrose tecidual, foram diagnosticados apenas dois animais positivos, um no tempo 2 no grupo controle e o outro no tempo 1 no grupo do tratamento. Por fim, não foi detectada presença de áreas de hemorragia em nenhum dos animais avaliados (tabela 11).

Tabela 11. Distribuição de frequências relativa às áreas de edema, necrose e hemorragia presentes no endométrio avaliadas pela histopatologia antes (tempo 1) e após (tempo 2) as insuflações uterinas.

Variável	Grupo experimental	Tempo	Graus			
			0	1	2	3
Edema	O2	1	44,44	55,56	0	0
		2	33,33	55,56	11,11	0
	O3	1	30,00	50,00	20,00	0
		2	50,00	40,00	10,00	0
Necrose	O2	1	100,00	0	0	0
		2	88,89	11,11	0	0
	O3	1	90,00	10,00	0	0
		2	100,00	0	0	0
Hemorragia	O2	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0
	O3	1	0	0	0	0
		2	0	0	0	0

O escore de edema, necrose e hemorragia: (escore 0) não foi observada a presença destes achados; (escore 1) leve; (escore 2) moderado; (escore 3) acentuado.
 $P > 0,05$.

Imagem 5. Seções histológicas do estroma endometrial evidenciando a presença de edema endometrial (*) nos dois grupos experimentais, antes e após o tratamento



Fonte: Autoria própria.

A avaliação do infiltrado inflamatório foi diferenciada pelo tipo celular presente, neutrófilos e linfócitos. No tempo 1 foram identificados quatro animais com infiltrado neutrofílico, um no grupo controle e três no grupo tratamento. Ao final do experimento, cinco animais possuíam neutrófilos no tecido endometrias, três no grupo controle e dois no tratamento. O infiltrado linfocitário foi mais frequente em relação ao neutrofílico, sendo encontrado, no tempo 1 em dez animais, dois no grupo controle e oito no grupo tratamento. Não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais assim como nos tempos observados com relação a presença de células inflamatórias endometriais avaliadas pela biópsia ($P > 0,05$) (tabela 12).

Tabela 12. Distribuição de frequências relativa à presença de infiltrado inflamatório neutrofílico e linfocitário endometrial das éguas avaliadas pela histopatologia antes (tempo 1) e após (tempo 2) as insuflações uterinas.

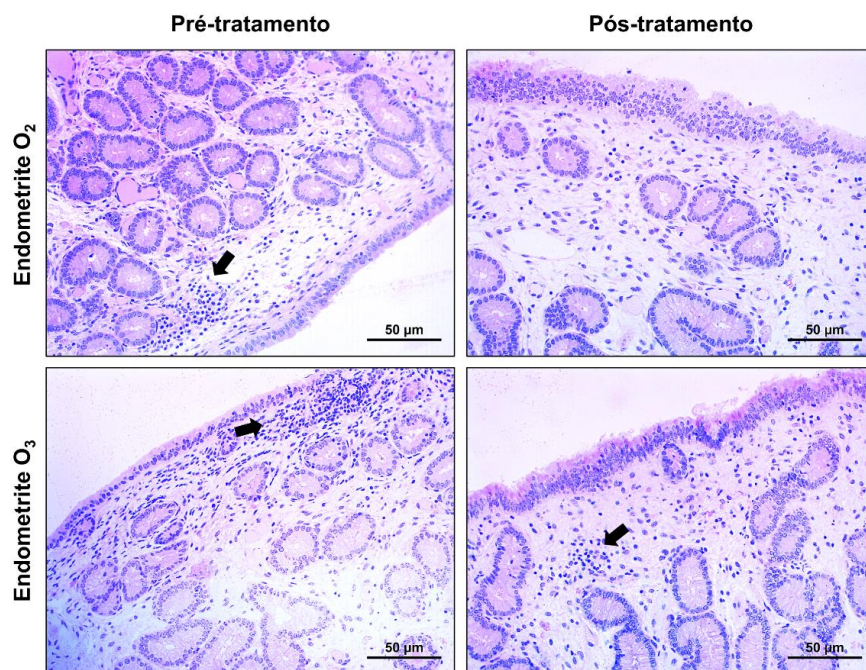
Variável	Grupo experimental	Tempo	Graus			
			0	1	2	3
Neutrófilos	O2	1	88,89	11,11	0	0
		2	66,67	33,33	0	0

	O3	1	70,00	30,00	0	0
		2	80,00	20,00	0	0
Linfócitos	O2	1	77,78	22,22	0	0
		2	22,22	66,67	11,11	0
	O3	1	20,00	80,00	0	0
		2	40,00	60,00	0	0

Escore de infiltrado inflamatório: (escore 0) não foi observada a presença de infiltrado; (escore 1) leve; (escore 2) moderado; (escore 3) acentuado.

P>0,05.

Imagem 6. Seções histológicas do estroma endometrial evidenciando a presença de infiltrado inflamatório linfocitário endometrial (setas) nos dois grupos experimentais, antes e após o tratamento



Fonte: Autoria própria.

5.2.5 Histomorfometria

A densidade média do epitélio glandular não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, grupos e tempos avaliados ($p > 0,05$). O valor médio do grupo controle antes e após o tratamento foi de 51.82 ± 1.85 e 51.95 ± 51.95 respectivamente e, o grupo tratamento, foi de 55.25 ± 1.57 no tempo 1 e 56.55 ± 1.34 no tempo 2. Avaliando-se a densidade de vasos sanguíneos e correlacionando-se com o tempo, grupo e tratamento, também não se observou

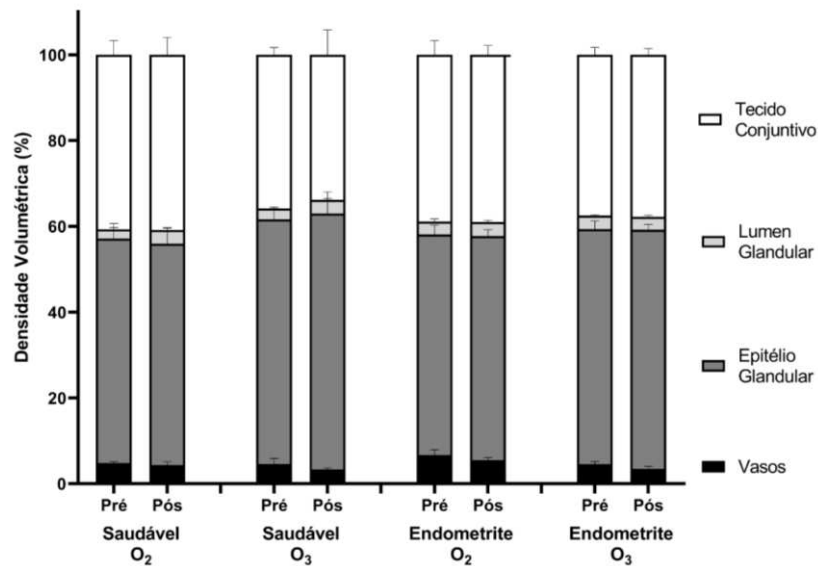
diferença estatística ($p > 0,05$). Com relação a densidade de lumens glandulares e de tecido conjuntivo, também não ocorreu diferença estatística, $p > 0,05$ (tabela 13 e gráfico 2).

Tabela 13. Média e erro padrão da densidade volumétrica do epitélio glandular, vasos sanguíneos, lúmen glandular e tecido conjuntivo realizada através da histomorfometria antes (tempo 1) e após (tempo 2) as insuflações uterinas.

Variável	Grupo experimental	Tempo	Média (μm)	Erro padrão
Epitélio Glandular	O2	1	51,82	1,85
		2	51,95	51,95
	O3	1	55,25	1,57
		2	56,55	1,34
Vasos Sanguíneos	O2	1	5,83	0,74
		2	4,98	0,47
	O3	1	4,55	0,54
		2	3,42	0,46
Lúmen Glandular	O2	1	2,65	0,39
		2	3,21	0,30
	O3	1	3,02	0,21
		2	3,03	0,28
Tecido Conjuntivo	O2	1	39,67	2,22
		2	39,84	2,01
	O3	1	37,16	1,40
		2	36,98	1,54

$P > 0,05$.

Gráfico 2. Média e erro padrão da densidade volumétrica do epitélio glandular, vasos sanguíneos, lúmen glandular e tecido conjuntivo realizada através da histomorfometria pré (tempo 1) e pós (tempo 2) as insuflações uterinas



Fonte: Autoria própria.

O valor médio da altura do epitélio luminal e glandular antes e após o tratamento, entre grupos e entre tratamentos não obteve diferença estatística ($p > 0,05$). O diâmetro glandular também não apresentou diferença estatística entre os parâmetros avaliados ($p > 0,05$) (tabela 14).

Tabela 14. Média e erro padrão da altura do epitélio luminal, do epitélio glandular e diâmetro glandular realizada através da histomorfometria antes (tempo 1) e após (tempo 2) as insuflações uterinas.

Variável	Grupo experimental	Tempo	Média (μm)	Erro padrão
Altura do Epitélio Luminal	O ₂	1	21,81	1,32
		2	23,77	1,64
	O ₃	1	23,32	1,06
		2	23,50	1,26
Altura do Epitélio Glandular	O ₂	1	18,98	0,36
		2	19,35	0,56
	O ₃	1	18,96	0,46
		2	18,74	0,62
Diâmetro Glandular	O ₂	1	53,04	0,46
		2	52,81	1,43

O3	1	52,59	1,25
	2	51,25	0,68

P>0,05.

6 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados na citologia uterina realizada a partir do LBV na avaliação prévia ao estudo foi condizente com o histórico reprodutivo obtido dos animais. De fato, a contagem média geral de PMN/campo encontrada foi maior do que a considerada normal (até 1 PMN/campo; FERRIS, 2016): 4.55 +/- 1.41 no experimento 1 e de 1.16 +/- 0.48 no experimento 2. Esses resultados corroboram com os achados da avaliação histopatológica realizada antes do tratamento, que identificou infiltrado inflamatório neutrofílico e leucocitário em seis e sete animais respectivamente no experimento 1; quatro éguas com infiltrado neutrofílico e dez com infiltrado leucocitário no experimento 2. As respostas aos patógenos são mediadas pelo sistema imune inato e adaptativo do organismo, sendo que estes dois mecanismos apresentam papel importante na saúde uterina. A resposta imunológica predominante no endométrio é a inata, sendo que os neutrófilos são a principal célula deste sistema, considerado a primeira linha de defesa contra os patógenos. Os linfócitos são células do sistema imune adaptativo, que após a apresentação de antígenos realizada por células do sistema imune inato, realizam a produção de anticorpos (SKARZYNSKI et al., 2020). Assim sendo, a presença de infiltrado neutrofílico endometrial é característica de uma reação inflamatória aguda e a presença de infiltrado linfocitário é indicativa de inflamação crônica (VAN CAMP, 1988).

A avaliação citológica no experimento 1, em que se utilizou éguas em anestro e que receberam benzoato de estradiol, apresentou uma média de PMN/campo alta. De fato, no decorrer das coletas, poucas éguas foram classificadas como normais pela avaliação citológica independentemente do tratamento. Durante o estro, mesmo em éguas saudáveis, é considerado normal a presença de pequena quantidade de PMN no útero, devido à migração de neutrófilos que ocorre naturalmente quando os níveis séricos de estrógeno estão elevados (KOZDROWSKI et al., 2015). Nessa ocasião, as células epiteliais endometriais secretam citocinas e os fibroblastos secretam fatores parácrinos que afetam o crescimento e diferenciação celular assim como aumentam a irrigação sanguínea do endométrio (WIRA; RODRIGUEZ-GARCIA; PATEL, 2015). O aumento da vascularização, da permeabilidade capilar e a migração de neutrófilos para o lúmen endometrial são influenciados pelas concentrações séricas dos hormônios sexuais, estrógeno e progesterona (MUELLER et al., 2000), podendo explicar a

aumento da média de PMN/campo encontrados na citologia das éguas em que se administrou o benzoato de estradiol.

Os resultados referentes a citologia obtidos no experimento 2 foram diferentes do observado no experimento 1. Constatou-se diferença estatística entre os tempos, tratamentos e grupos experimentais avaliados. Os animais classificados sem endometrite foram capazes de reduzir a contagem de PMN/campo independentemente do tratamento aplicado. De fato, éguas consideradas saudáveis, ou seja aquelas resistentes a endometrite, possuem as barreiras físicas e imunológicas trabalhando de forma a eliminar quaisquer agentes que possam entrar em contato com o útero e por fim, retornar a homeostase do órgão (KATILA, 2008). Vale ressaltar que a contagem citológica alta obtida no tempo 1 para o grupo sem endometrite provavelmente se deve à irritação endometrial causada pela biópsia, realizada 48h antes.

O grupo controle de éguas com endometrite não apresentou a mesma habilidade de redução da inflamação observado nas éguas sem endometrite, de forma que ao final do experimento ainda apresentavam uma contagem alta de PMN/campo. No entanto, as éguas com endometrite submetidas ao tratamento com ozônio demonstraram redução na citologia. Ávila et al., 2022, trabalhando apenas com animais positivos na cultura microbiológica uterina e realizando a insuflação uterina com a mistura gasosa ozônio-oxigênio na concentração de 40 μ /mL por 10 minutos, encontrou resultados semelhantes e concluiu que o ozônio foi capaz de reduzir a inflamação uterina em éguas classificadas com endometrite.

Efeito semelhante foi relatado ao utilizar 50 mL de solução estéril destilada ozonizada (50 μ g por 15 minutos) intrauterino em vacas com 35 dias pós-parto. Realizou-se uma citologia antes e 72h após o tratamento, observou-se uma contagem de PMN menor, de 3.7 ± 1.4 no grupo tratamento, em relação ao grupo controle, $7.6 \pm 1.1\%$. Concluiu-se que a aplicação do ozônio como descrita no trabalho foi efetiva para a redução de endometrites subclínicas em vacas no sistema extensivo (ESCANDÓN et al., 2020). Acredita-se que a redução da inflamação após os tratamentos com ozônio seja via inibição de citocinas pró inflamatórias e da fosfolipase A2, em conjunto com um estímulo a produção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 e fator de necrose tumoral β 1 (ÁVILA et al., 2022; JANIC et al., 2003).

TARTARI et al., 2020 estudaram os níveis de IL-10, IL-12p70, TNF- α , INF- γ , e MCP-1 na cartilagem articular, em modelo murinho de osteoartrite de joelho, e o efeito do tratamento com ozônio injetado diretamente no joelho. Foi relatado que o ozônio atuou como anti-inflamatório reduzindo os níveis de IL-12p70 e TNF- α (citocinas pró-inflamatórias) e aumentando a

produção de IL-10 (citocina anti-inflamatória). Esses autores ressaltaram ainda que a ozonioterapia foi capaz de reduzir a inflamação e que os resultados foram mais expressivos quando avaliados 72h após a aplicação.

A avaliação histopatológica não detectou a presença de alterações glandulares em nenhum momento dos experimentos, incluindo grupo controle e grupo tratado, indicando que o oxigênio e a mistura gasosa oxigênio-ozônio não causaram lesões degenerativas no endométrio. No experimento 1 foi observada grande frequência de éguas com edema endometrial e redução do grau no tempo 2 em todos os grupos. A diminuição dos graus de edema detectados nas éguas que receberam aplicação exógena de estrógeno pode ser explicada pela diminuição do efeito hormonal com o passar do tempo, pois o mesmo padrão se repetiu nos dois grupos experimentais. Diferentemente do observado no experimento 2, em que ocorreu redução da presença e grau de edema endometrial no grupo tratado.

A necrose endometrial não foi um achado comum nas biópsias uterinas, sendo detectada em apenas três animais no experimento 1 e um animal no experimento 2, esta mesma frequência foi mantida nos dois tempos avaliados. As áreas de hemorragia foram mais frequentes no experimento 1, sendo que se observou redução na sua frequência no tempo 2 no grupo tratado com a mistura gasosa-oxigênio-ozônio. No experimento 2 não houve o diagnóstico de nenhuma égua com a presença de hemorragia, nem antes e nem após o tratamento nos dois grupos experimentais. A presença de hemorragia endometrial pode ser fisiológica, acontecendo com maior frequência no estro (SASANI; GHARAGOZLOU, 2002), explicando a presença desses achados apenas no experimento 1.

Os resultados histopatológicos foram similares aos descritos por Ferreira et al., 2021, que avaliaram os efeitos da insuflação intrauterina da mistura gasosa oxigênio-ozônio no endométrio de éguas na concentração de 21 e 42 µg/ml pela histopatologia e histomorfometria. Esses autores também não observaram mudanças histopatológicas associadas à degeneração endometrial, como fibrose periglandular e atrofia endometrial. Áreas discretas de hemorragia multifocal foram detectadas em todas as amostras e, por fim, nas amostras após o experimento, constatou-se a presença de infiltrado inflamatório, mas sem indicativos de necrose tecidual.

A densidade volumétrica referente aos vasos sanguíneos endometriais em ambos os experimentos foi distinta àquela observada por Ferreira et al. (2021) que constataram efeito positivo nos parâmetros vasculares associados aos grupos tratamento, o aumento de vasos sanguíneos e do grau de vascularização endometrial. Deve-se ressaltar que o intervalo entre a

última insuflação e a coleta da biópsia realizado por Ferreira et al. (2021) foi de 24h e, no presente estudo, foi de aproximadamente 8 dias.

Calderon et al. (2016) avaliaram a altura do epitélio colunar, vasos sanguíneos endometriais e células do estroma em mulheres observando um efeito positivo da irrigação uterina com solução salina ozonizada sobre esses parâmetros e concluindo que o tratamento apresentou efeitos favoráveis sobre a histologia tecidual. No entanto, ponderam que mais estudos devem ser realizados para avaliar a receptividade endometrial assim como as taxas de gestação.

7 CONCLUSÃO

A aplicação intrauterina da mistura gasosa oxigênio-ozônio na concentração de 44 µg/mL, assim como do gás oxigênio, em éguas não implicou em alterações citológicas, histopatológicas e histomorfométricas compatíveis com degeneração do tecido endometrial. A arquitetura endometrial observada na histologia e histomorfometria se manteve semelhante antes e após o experimento, tanto no grupo tratado quanto no controle. Ocorreu redução na contagem de PMN/campo após o protocolo de insuflações uterinas com a mistura gasosa oxigênio-ozônio nas éguas diagnosticadas com endometrite, indicando que este tratamento pode auxiliar na redução da inflamação uterina.

8 REFERÊNCIAS

- AL-SAADI, H. et al. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing *Staphylococcus aureus* in vitro: A potential irrigant for infected wounds. **International Wound Journal**, v. 13, n. 5, p. 936–942, 2016.
- ALBIHN, A.; BÅVERUD, V.; MAGNUSSON, U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, n. 3–4, p. 121–129, 2003.
- ALVES, G. E. S. et al. Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 433–437, 2004.
- AUPPERLE, H. et al. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the physiological and pathological inactivity of the equine endometrium. **Pferdeheilkunde**, v. 19, n. 6, p. 629–632, 2003.
- ÁVILA, A. C. A. et al. Effectiveness of Ozone Therapy in The Treatment of Endometritis in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 112, p. 103900, 2022.
- BHATT, J.; BHAT, A. R.; DHAMA, K. An overview of ozone therapy in equine - an emerging healthcare solution. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 4, p. 203–210, 2016.
- BIAZZO, A.; CORRIERO, A. S.; CONFALONIERI, N. Intramuscular oxygen-ozone therapy in the treatment of low back pain. **Acta Biomedica**, v. 89, n. 1, p. 41–46, 2018.
- BRITO, L.; BARTH, A. Endometritis in mares. **Veterinary Rounds**, v. 3, n. 9, 2003.
- CALDERON, I. et al. The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium – A preliminary study. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 36, n. 5, p. 635–640, 2016a.
- CALDERON, I. et al. The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium – A preliminary study. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 36, n. 5, p. 635–640, 2016b.
- CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, LORENZO G.T.M FEDORKA, C. E. Persistent breeding-induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1432, 2020.
- CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E. Persistent breeding-

induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, 2020.

CANISSO, I. F.; STEWART, J.; COUTINHO DA SILVA, M. A. Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 465–480, 2016.

CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron**, v. 34, n. 8, p. 365–372, 2003.

DELERUE, M. et al. Acute Endometritis due to *Taylorella equigenitalis* Transmission by Insemination of Cryopreserved Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 78, p. 10–13, 2019.

DIEL DE AMORIM, M. et al. Comparison of Clinical Signs, Endometrial Culture, Endometrial Cytology, Uterine Low-Volume Lavage, and Uterine Biopsy and Combinations in the Diagnosis of Equine Endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 44, p. 54–61, 2016.

DINI, P. et al. Effect of environmental factors and changes in the body condition score on the onset of the breeding season in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 7, p. 987–995, 2019.

DJURICIC, D. et al. Effect of preventive intrauterine ozone application on reproductive efficiency in Holstein cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, p. 87–91, 2012.

ĐURIČIĆ, D. et al. Comparison of Intrauterine Antibiotics versus Ozone Medical Use in Sheep with Retained Placenta and Following Obstetric Assistance. **Reproduction in domestic animals**, v. 51, n. 4, p. 538–540, 2016.

ESCANDÓN, B. M. et al. Intrauterine therapy with ozone reduces subclinical endometritis and improves reproductive performance in postpartum dairy cows managed in pasture-based systems. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 5, p. 2523–2528, 2020.

FERREIRA, J. C. et al. Hemodynamics of the corpus luteum in mares during experimentally impaired luteogenesis and partial luteolysis. **Theriogenology**, v. 107, p. 78–84, 2018.

FERREIRA, J. C. et al. The In Vitro Effect of Ozone Therapy Against Equine *Pythium insidiosum*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 98, p. 103305, 2021.

FERRIS, R. A. Endometritis: Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 481–498, 2016.

FERRIS, R. A. Therapeutics for Infectious Endometritis: A Clinical Perspective Opções terapêuticas nas endometrites infecciosas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 175–179, 2017.

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

FRADINHO, M. J. et al. Effects of body condition and leptin on the reproductive performance of Lusitano mares on extensive systems. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, p. 1214–1222, 2014.

FRISO, A. M. et al. Perioovulatory administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. **Theriogenology**, v. 138, p. 24–30, 2019.

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

FUMUSO, E. A. et al. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, n. 1–2, p. 30–39, 2007.

GINTHER, O. et al. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 31–44, 2004.

GINTHER, O. J. Folliculogenesis during the transitional period and early ovulatory season in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 1, p. 311–320, 1990.

GINTHER, O. J.; PIERSON, R. A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 505–516, 1984.

GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J. Dynamics of uterine diameter and endometrial morphology during the estrous cycle and early pregnancy in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 25, n. 2, p. 133–142, 1991.

HERNANDEZ, F.; MENÉNDEZ, S.; WONG, R. Decrease of blood cholesterol and

stimulation of antioxidante response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 1, p. 115–119, 1995.

HERRERA, M. et al. Comparative histomorphological study of endometrium in mares.

Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia, v. 47, n. 2, p. 153–158, 2018.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. the Oestrous Cycle of the Mare and Its Uterine Control. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, n. 9, p. 415–419, 1977.

INOUE, Y.; SEKIGUCHI, M. Vestibuloplasty for Persistent Pneumovagina in Mares.

Journal of Equine Veterinary Science, v. 48, p. 9–14, 2017.

JANIC, B. et al. An in vitro cell model system for the study of the effects of ozone and other gaseous agents on phagocytic cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 272, n. 1–2, p. 125–134, 2003.

KATILA, T. Histology of the Post Partum Equine Uterus as Determined by Endometrial Biopsies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 29, n. 2, p. 173–180, 1988.

KATILA, T. What do we know about susceptibility of mares to endometritis?

Pferdeheilkunde, v. 24, n. 1, p. 61–65, 2008.

KATILA, T. Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 3, p. 189–196, 2016.

KATILA, T.; FERREIRA-DIAS, G. Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 779, 2022.

KOZDROWSKI, R. et al. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 154, p. 56–62, 2015.

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

LEBLANC, M. M.; ASBURY, A. C.; LYLE, S. K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50 (6), p. 864–867, 1989.

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. Estudo do complexo do Agronegócio do cavalo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 56, 2016.

- LINTON, J. K.; SERTICH, P. L. The impact of low-volume uterine lavage on endometrial biopsy classification. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1004–1007, 2016.
- MERHI, Z. et al. Ozone therapy: A potential therapeutic adjunct for improving female reproductive health. **Medical Gas Research**, v. 9, n. 2, p. 101–105, 2019.
- MORLEY, S. A.; MURRAY, J. A. Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 7, p. 842–853, 2014.
- MORRIS, L. H. A.; MCCUE, P. M.; AURICH, C. Equine endometritis: a review of challenges and new approaches. **Reproduction**, v. 160, n. 5, p. 95–110, 2020.
- MUELLER, M. D. et al. Neutrophils infiltrating the endometrium express vascular endothelial growth factor: Potential role in endometrial angiogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 1, p. 107–112, 2000.
- NIKURA, T. et al. Effect of prostaglandin F₂ α administration on uterine polymorphonuclear neutrophil counts in Japanese heavy draft horses. **Journal of Equine Science**, v. 32, n. 4, p. 117–124, 2021.
- PAOLONI, M. et al. Intramuscular oxygen-ozone therapy in the treatment of acute back pain with lumbar disc herniation: A multicenter, randomized, double-blind, clinical trial of active and simulated lumbar paravertebral injection. **Spine**, v. 34, n. 13, p. 1337–1344, 2009.
- PASOLINI, M. P. et al. Endometritis and Infertility in the Mare – The Challenge in Equine Breeding Industry—A Review. **Genital Infections and Infertility**, 2016.
- PINTO, R. F. C. Reproductive Evaluation of the Mare. In: DASCANIO, J. J.; MCCUE, P. M. (Eds.). . **Equine Reproductive Procedures**. [s.l.] Wiley Blackwell, 2014. p. 343–358.
- PRIOR, W. A.; SQUADRITO, G. L.; FRIEDMAN, M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity : The role of lipid ozonation products Related papers Detection of Aldehydes in Bronchoalveolar Lavage of Rats Exposed to Ozone. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 6, p. 935–941, 1995.
- RASMUSSEN, C. D. et al. Equine Infectious Endometritis-Clinical and Subclinical Cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 2, p. 95–104, 2015.
- REGHINI, M. F. S. et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares

- treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 516–522, 2015.
- RESITOGLU, B. et al. The Efficacy of ozone therapy in neonatal rats with hypoxic ischemic brain injury. **Bratisl Med Journal**, v. 119, n. 2, p. 81–85, 2018.
- RICKETTS, S. W.; BARRELET, A. The ability of mares to respond to treatment for uterine abnormalities diagnosed by endometrial biopsy and some causes for failure to respond - A review of 1099 cases. **Pferdeheilkunde**, v. 17, n. 6, p. 644–649, 2001.
- RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 395–402, 2007.
- RUA, M. A. S. et al. Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares. **Theriogenology**, v. 114, p. 285–292, 2018.
- SAGAI, M.; BOCCI, V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? **Medical Gas Research**, v. 1, n. 1, p. 1–18, 2011.
- SASANI, F.; GHARAGOZLOU, F. Interpretation of Endometrial Lesions and Infertility in Mares. **Arch. Razi Ins**, p. 105–109, 2002.
- SCHÖNIGER, S.; SCHOON, H. A. The healthy and diseased equine endometrium: A review of morphological features and molecular analyses. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 625, 2020.
- SCIORSI, R. L. et al. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 240–246, 2020.
- SCOGGIN, C. F. Not just a number: Effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in thoroughbred brood-mares. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 6, p. 872–879, 2015.
- SCOGGIN, C. F. Endometritis: Nontraditional Therapies. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 499–511, 2016.
- SCOTT, C. J. A review of fungal endometritis in the mare. **Equine Veterinary Education**, v. 32, n. 8, p. 444–448, 2020.
- SIKORA, M. et al. The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 1–10, 2016.

SKARZYNSKI, D. J. et al. Neutrophils, monocytes and other immune components in the equine endometrium: Friends or foes? **Theriogenology**, v. 150, p. 150–157, 2020.

SNIDER, T. A.; SEPOY, C.; HOLYOAK, G. R. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1567–1581, 2011.

SQUIRES, E. L. Embryo transfer challenges and perspectives. **Revista Brasileira Reproducción Animal**, v. 37, n. 2, p. 105–107, 2013.

TROEDSSON, M. H. T. et al. Multiple site electromyography of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 2, p. 307–313, 1993.

TSUZUKI, N. et al. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 12, p. 1647–1650, 2016.

VAN CAMP, S. D. Endometrial biopsy of the mare. A review and update. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 4, n. 2, p. 229–245, 1988.

WIDDERS, P. R. et al. Immunohistological studies of the local immune system in the reproductive tract of the mare. **Research in Veterinary Science**, v. 38, n. 1, p. 88–95, 1985.

WIRA, C. R.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.; PATEL, M. V. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 4, p. 217–230, 2015.

WONG, D. M.; DAVIS, J. L.; WHITE, N. A. Equine fungal endometritis. **Equine Veterinary Education**, v. 23, n. 2, p. 88–100, 2001.

XING, B. et al. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury via modulation of the TLR4-Nf- κ B pathway. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 60–66, 2015.

ANEXO 1 - CLASSIFICAÇÃO DO ECC EM CAVALOS

ESCORE	DESCRIÇÃO
1	Extremamente magro Sem tecido adiposo palpável e estrutura óssea da cernelha e escápula facilmente palpáveis; Processos espinhosos lombares, inserção da cauda, costelas e tuber do coxal proeminentes;
2	Muito magro Pouca quantidade de tecido adiposo e estruturas ósseas da cernelha, pescoço e escápula palpáveis; Processos espinhosos lombares, inserção da cauda, costelas, tuber do coxal proeminentes;
3	Magro Tecido adiposo cobrindo metade dos processos espinhosos lombares, processos transversos lombares não palpáveis e fina camada de tecido adiposo cobrindo as costelas Processos espinhosos e costelas facilmente identificados, tuber do coxal arredondado, tuberosidade isquiática não visível e a estrutura óssea da cernelha, pescoço e escápulas pouco perceptíveis;
4	Moderadamente magro Sulco ao longo da coluna, ténue contorno das costelas, tecido adiposo palpável na inserção da cauda; Tuber do coxal não se apresenta mais visível e estrutura óssea da cernelha, pescoço e escápulas pouco perceptíveis;
5	Moderado Coluna nivelada e com costelas não são visualizadas, mas facilmente palpadas e tecido adiposo macio à palpação na inserção da cauda; Pescoço e escápula com presença de tecido adiposo, conferindo ao animal uma conexão “fluida” dessas estruturas com o restante do corpo;
6	Moderadamente gordo Pequena depressão na linha da coluna, com tecido adiposo sobre as costelas e inserção de cauda se apresentam esponjosos a palpação; Início da deposição de tecido adiposo na cernelha, pescoço e caudal a escápula;
7	Gordo Depressão na linha da coluna e com costelas palpáveis, mas o tecido adiposo entre elas pode ser sentido; Tecido adiposo macio à palpação na inserção da cauda e deposição de tecido adiposo na cernelha, pescoço e caudal a escápula;
8	Muito gordo Depressão na linha da coluna, dificuldade para palpar as costelas, tecido adiposo muito macio à palpação na inserção da cauda e região caudal da escápula preenchida com tecido adiposo; Espessamento do pescoço perceptível e deposição de tecido adiposo na região interna proximal caudal dos membros pélvicos;
9	Extremamente gordo Depressão óbvia na linha da coluna e tecido adiposo irregular recobrimo as costelas, excesso de gordura na inserção da cauda, escápula e no pescoço, assim como na região interna proximal caudal dos membros pélvicos; Região ventral aos processos transversos lombares preenchida com tecido adiposo;

Fonte: adaptado de Henneke et al. 1983.

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA - UFV**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 32/2021, intitulado **“Efeito do ozônio endométrio e marcadores do estresse oxidativo de éguas”**, coordenado pela professora Bruna Waddington de Freitas do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTIC, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 07/06/2021, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 32/2021, named **“Effect of endometrial ozone and markers of oxidative stress in mares”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008, Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTIC, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTIC therefore being approved by the Committee on June 07, 2021 valid for 12months.



Prof. Mariella Bontempo Duca de Freitas
Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

ANEXO 3 – FICHA DE ACOMPANHAMENTO REPRODUTIVO



Ficha de Acompanhamento Reprodutivo



Proprietário: _____

Data: ___/___/___

Haras: _____

Cidade: _____

Animal: _____

Idade: _____

Raça: _____ Pelagem: _____ Particularidade: _____

Doadora () Matríz () Receptora ()

Escore de condição corporal: ___/9 Peso: _____ kg

Histórico reprodutivo

Número de gestações: _____ Número de potros viáveis: _____

Histórico de aborto ou distocia: () Não () Sim – quando, causa, ficou gestante após o episódio?

Histórico de infertilidade - perdas embrionárias precoces, quantas estações de monta vazia, endometrite persistente pós-cobertura, endometrite infecciosa (diagnosticada via cultura? bactérias, fungos):

Exames laboratoriais realizados:

Tratamentos realizados:

Outras enfermidades:

Exame clínico reprodutivo

- **Avaliação da conformação do períneo:**

1. **Anus deslocado cranialmente?** () não () sim

2. **Vulva**

- a. () vertical () horizontal
- b. () bordas cooptadas () bordas não cooptadas – presença de cicatrizes?
- c. comprimento vulvar (cm) _____
- d. cm **abaixo** do assoalho pélvico _____
- e. cm **acima** do assoalho pélvico _____
- f. angulação vulvar – dois avaliadores: _____/_____

Observação:

3. **Teste “Wind-suck”:** () Negativo () Positivo

• **Palpação e Ultrassonografia Transretal**

1. Útero penduloso? () não () sim

Data	Tônus	Cérvix	Edema	Ovário Direito	Ovário Esquerdo	Observação

2. Líquido intrauterino () não () sim - _____ cm e aspecto _____

3. Presença de cistos? _____

4. Observação: _____

- Palpação digital da cérvix: () normal () outro:
-

• **Avaliação macroscópica do Lavado de Baixo Volume (LBV):**

LVB 0: Limpo () Turvo + () Turvo ++ () Turvo +++

LVB 1: Limpo () Turvo + () Turvo ++ () Turvo +++

LVB 2: Limpo () Turvo + () Turvo ++ () Turvo +++

LVB 3: Limpo () Turvo + () Turvo ++ () Turvo +++

LVB 4: Limpo () Turvo + () Turvo ++ () Turvo +++

• **Avaliação citológica:**

LBV0: PMN/Campo:

PMN/ Células endometriais:

LBV1: PMN/Campo:

PMN/ Células endometriais:

LBV2: PMN/Campo:

PMN/ Células endometriais:

LBV3: PMN/Campo:

PMN/ Células endometriais:

LBV4: PMN/Campo:

PMN/ Células endometriais:

- **Biópsia uterina**

Primeira coleta: ___/___/___ - Corno () esquerdo () direito

Segunda coleta: ___/___/___ - Corno () esquerdo () direito
