



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

EFEITOS DA OZÔNIOterapia NA INFLAMAÇÃO, CONTAMINAÇÃO

UTERINA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE Éguas.

JULLYANA DE SOUZA SILVA

DISSERTAÇÃO DE Mestrado em Saúde Animal

BRASÍLIA - DF

NOVEMBRO/2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**EFEITOS DA OZÔNIOterapia NA INFLAMAÇÃO, CONTAMINAÇÃO
UTERINA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE Éguas.**

JULLYANA DE SOUZA SILVA

ORIENTADOR: RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA - DF

NOVEMBRO/2024

EFEITOS DA OZÔNIOterapia NA INFLAMAÇÃO, CONTAMINAÇÃO

UTERINA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE ÉGUAS.

JULLYANA DE SOUZA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL. O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR – BRASIL (CAPES) – CÓDIGO DE FINANCIAMENTO 001.

APROVADO POR:

Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira (Universidade de Brasília, DF)

Dra. Fernanda Saules Ignácio (UNESP Botucatu, SP)

Dr. Jair Camargo Ferreira (UNIFRAN, SP)

Brasília- DF

2024

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, obrigada pela oportunidade de participar em um programa de grande renome e por todo apoio recebido durante esse período.

- SILVA, J. S. Efeitos da ozonioterapia na inflamação, contaminação uterina e produção
1 embrionária de éguas. Brasília, 2024. 42p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade
2 de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

DD278 De Souza Silva , Jullyana
Efeitos da ozonioterapia na inflamação e contaminação
uterina e produção embrionária de éguas subfêrteis. /
Jullyana De Souza Silva ; orientador Rodrigo Arruda de
Oliveira. -- Brasília, 2024.
42 p.

Dissertação (Doutorado em Administração) -- Universidade
de Brasília, 2024.

1. biópsia. 2. citologia. 3. cultura. 4. endometrite. 5.
ozônio. I. Arruda de Oliveira, Rodrigo , orient. II. Título.

ÍNDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE QUADROS	IX
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	X

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 Endometrite	11
1.2 Etiologia da endometrite infecciosa	11
1.3 Diagnóstico	13
1.3.1 Cultura microbiológica.....	13
1.3.2 Citologia uterina	13
1.3.3 Biópsia uterina.....	14
1.4 Tratamento	14
1.4.1 Terapias convencionais	15
1.4.1.1 Lavagem uterina	15
1.4.1.2 Agentes ecbólicos	15
1.4.1.3 Antibióticos.....	16
1.4.1.4 Vulvoplastia	16
1.4.2 Terapias integrativas.....	17
1.4.2.1 Agentes imunomoduladores.....	17

1.4.2.2 Plasma rico em plaquetas	17
1.4.2.3 Células tronco	18
1.4.2.4 Ozônioterapia	19
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
 CAPÍTULO 2	
RESUMO	27
ABSTRACT.....	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 Animais	30
2.2 Delineamento Experimental.....	30
2.3 Parâmetros Avaliados	31
2.4 Análise Estatística	33
3. RESULTADOS	33
4. DISCUSSÃO.....	35
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

CAPÍTULO 1

RESUMO

A endometrite figura entre as principais causas de infertilidade em éguas, constituindo uma relevante preocupação clínica no âmbito da reprodução equina. Essa condição decorre de processos inflamatórios desencadeados por agentes infecciosos, como bactérias e fungos, ou por fatores não infecciosos, tais como sêmen e detritos uterinos. A inflamação pode ser transitória, como ocorre em respostas fisiológicas pós-cobertura, ou evoluir para quadros patológicos, resultando em endometrite crônica, subclínica ou persistente, comprometendo negativamente a fertilidade. Os métodos diagnósticos incluem cultura microbiológica, citologia uterina, ultrassonografia e biópsia endometrial, sendo esta última considerada o padrão-ouro na detecção de fibrose e na avaliação da saúde uterina. O tratamento tem por objetivo restaurar a funcionalidade uterina, permitindo a concepção e manutenção da gestação. As abordagens convencionais envolvem a lavagem uterina, o uso de agentes ecbólicos e a administração de antibióticos. Todavia, a crescente resistência antimicrobiana e os frequentes insucessos terapêuticos têm incentivado a busca por alternativas inovadoras, destacando-se a ozonioterapia; A ozonioterapia utiliza o gás ozônio, amplamente reconhecido por suas propriedades germicidas, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e regenerativas. No contexto da reprodução equina, sua aplicação por insuflação intrauterina tem demonstrado eficácia na redução de microrganismos e na mitigação de processos inflamatórios uterinos. Além disso, a terapia estimula a angiogênese, favorecendo a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), essencial para a formação de novos vasos sanguíneos e a recuperação tecidual. Ademais, o ozônio exerce um papel modulador no sistema imunológico, promovendo a produção de citocinas anti-inflamatórias e inibindo as pró-inflamatórias, contribuindo, assim, para a restauração de um ambiente uterino saudável e adequado à reprodução.

Palavras-chave: bactérias, endometrite, equinos, fertilidade em medicina-integrativa.

ABSTRACT

Endometritis is one of the leading causes of infertility in mares, representing a significant clinical concern in equine reproduction. This condition results from inflammatory processes triggered by infectious agents, such as bacteria and fungi, or non-infectious factors such as semen and uterine debris. The inflammation can be transient, as seen in physiological post-mating responses, or evolve into pathological conditions, leading to chronic, subclinical, or persistent endometritis, which negatively impacts fertility. Diagnostic methods include microbiological culture, uterine cytology, ultrasonography, and endometrial biopsy, with the latter being considered the gold standard for detecting fibrosis and evaluating uterine health. The goal of treatment is to restore uterine functionality, enabling conception and the maintenance of pregnancy. Conventional approaches include uterine lavage, the use of ecboic agents, and the administration of antibiotics. However, the growing issue of antimicrobial resistance and frequent therapeutic failures have driven the search for innovative alternatives, with ozone therapy standing out. Ozone therapy uses ozone gas, widely recognized for its germicidal, anti-inflammatory, immunomodulatory, and regenerative properties. In the context of equine reproduction, its application through intrauterine insufflation has shown effectiveness in reducing microorganisms and mitigating uterine inflammatory processes. Furthermore, the therapy stimulates angiogenesis, promoting the production of vascular endothelial growth factor (VEGF), essential for the formation of new blood vessels and tissue recovery. Additionally, ozone plays a modulatory role in the immune system, promoting the production of anti-inflammatory cytokines and inhibiting pro-inflammatory ones, thus contributing to the restoration of a healthy uterine environment conducive to reproduction.

Keywords: bacteria, endometritis, equine, fertility and integrative-medicine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citologia uterina (média $\pm$ desvio padrão) para neutrófilos polimorfonucleares em 3 ciclos estrais sucessivos, G1 (ciclo controle), G2 (ciclo tratamento com mistura O₂-O₃) e G3 (ciclo pós-tratamento).	33
Tabela 2. Ocorrência em (%) de colônias bacterianas, no ambiente uterino de éguas, detectadas por meio da análise de culturas provenientes da colheita de amostras; realizada através da utilização de guia metálica, equipado com <i>swab</i> estéril e descartável, em 3 ciclos estrais sucessivos, G1 (ciclo controle), G2 (ciclo tratamento com mistura O₂-O₃) e G3 (ciclo pós-tratamento), no dia da indução da ovulação (0h) e 72h após a indução.	33
Tabela 3. Categorização dos graus de inflamação uterina, obtidos através da análise de um fragmento retirado por biópsia uterina, antes (1ª colheita, G1) e após o tratamento (segunda colheita, G3) com insuflação uterina de mistura de gás O₂-O₃.	

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

70	
71	
72	CEUA: Comitê de uso e experimentação animal
73	CTM: Células tronco mesenquimal
74	E2: Estradiol
75	EPPC: Endometriose persistente pós cobertura
76	FSH: Hormônio folículo-estimulante
77	G1: Grupo 1
78	G2: Grupo 2
79	G3: Grupo 3
80	hCG: Gonadotrofina coriônica humana
81	H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio
82	IA: Inseminação artificial
83	IM: Intramuscular
84	IV: Intravenosa
85	LH: Hormônio luteinizante
86	MSC: Células tronco mesenquimatosas
87	O ₂ : Oxigênio
88	O ₃ : Ozônio
89	PGF _{2α} : Prostaglandina F _{2α}
90	PBIE: Endometriose persistente induzida pela reprodução
91	PMNs: Neutrófilos polimorfonucleares
92	PRP: Plasma rico em plaquetas
93	T4: Tiroxina
94	TSA: teste de suscetibilidade do antibiótico
95	µg: Micrograma
96	UI: Unidade Internacional

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Endometrite

A endometrite é a maior causa de infertilidade nas éguas, sendo apontada como a terceira afecção clínica mais comum depois da síndrome cólica e das afecções do trato respiratório (TROEDSSON, 1999). O processo inflamatório induzido pós-cobertura pelo sêmen e por microrganismos é um evento fisiológico e necessário para manter o ambiente uterino adequado para o recebimento do embrião. Entretanto, algumas éguas consideradas susceptíveis à endometrite são incapazes de debelar esse processo inflamatório no tempo adequado e desenvolvem endometrite persistente pós-cobertura, resultando em altos índices de perda embrionária (WATSON, 2000). Para isso o útero possui um mecanismo eficiente de defesa, que por inúmeros fatores pode se tornar falho, o que leva a um processo patológico e a um grande prejuízo econômico nos criatórios (CANISSO et al., 2020).

A endometrite pode ser categorizada em diferentes tipos: persistente pós-cobertura, crônica, subclínica, infecciosa e aguda pós-parto (KATILA, 2016). Onde quando de origem infecciosa, há a identificação de microrganismos como causadores da condição (CANISSO et al., 2020). Os sintomas clínicos mais comuns da endometrite incluem a presença de líquido intrauterino, hiper-edema, encurtamento do ciclo estral, vaginite, cervicite, exsudato mucopurulento e perda embrionária precoce. Essas manifestações clínicas podem variar em intensidade dependendo da causa e do tipo de patógeno envolvido (DIEL DE AMORIM et al., 2015).

Uma égua saudável, especialmente no que diz respeito ao sistema reprodutivo, tem a capacidade de combater a contaminação uterina com uma resposta inflamatória transitória. Isso inclui a ativação do sistema imunológico, recrutamento de neutrófilos, liberação de prostaglandinas e aumento da contração uterina. Éguas que respondem à agressão local são consideradas resistentes à endometrite. Por outro lado, éguas que não possuem uma resposta rápida e eficaz são consideradas suscetíveis (BRINSKO, et al., 2011).

1.2 Etiologia da endometrite infecciosa

A endometrite pode ser causada por diferentes agentes, sendo eles, detritos, bactérias, fungos ou vírus. Eles terão acesso ao útero devido a anatomia genital da égua, (BRINSKO et al. 2011), a comunicação entre a vagina e o útero para entrada de microrganismos se dá pela abertura da cérvix durante o período de estro, e ao lúmen uterino ser próximo a vagina,

facilitando o acesso (HEIL et al., 2019). Podendo ser acometido durante o parto, cobertura ou inseminação artificial ou até mesmo exame clínico genital (BRINSKO et al. 2011).

A endometrite em éguas é uma condição inflamatória do útero que pode ser desencadeada por diversos fatores geralmente associados à invasão do ambiente uterino por bactérias ou fungos, desencadeando uma resposta imunológica local. Assim, a endometrite infecciosa é reconhecida como uma das doenças reprodutivas mais significativas em éguas. Entre os principais patógenos isolados do trato reprodutivo de éguas com histórico de infertilidade, destacam-se *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Klebsiella* spp., conforme documentado por Ferris (2016). Além disso, infecções uterinas causadas por *Candida albicans* e *Aspergillus* spp. são comuns em éguas que habitam regiões tropicais, conforme relatado por Nascimento Junior et al. (2021).

A migração de bactérias da flora vaginal para o interior do útero é frequentemente apontada como uma causa primária de endometrites em éguas, esse deslocamento bacteriano pode ocorrer durante procedimentos de inseminação artificial, exames ginecológicos ou mesmo durante o parto, quando a barreira natural da cérvix encontra-se em estado de relaxamento (CHAVES, 2011).

O biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana complexa que se forma quando as bactérias e/ou fungos se aderem a uma superfície, produzindo uma matriz extracelular composta de proteínas, carboidratos e DNA. A capacidade que alguns microrganismos têm de produzir biofilme oferece resistência às condições adversas, fazendo assim com que éguas com suscetibilidade tenham maior probabilidade de desenvolver infecções crônicas (FERRIS, 2017).

Podendo estar associadas as infecções bacterianas, as endometrites de origem fúngicas são condições menos frequentes (1-5%), apesar de se destacarem as observações onde a ocorrência de endometrites fúngicas sejam em grande parte das vezes identificadas como oportunistas, tendo sua maior incidência quando os animais já foram submetidos a repetidos tratamentos com antibioticoterapia (STOUT, 2008). Habitualmente os fungos mais isolados são *Aspergillus* sp e *Candida albicans*, entretanto outras espécies como *Mucor* sp também podem ser encontradas com menor frequência (BELTAIRE et al., 2012).

1.3 Diagnóstico

Os métodos diagnósticos são sensíveis e específicos, onde irão influenciar a percepção da prevalência da endometrite e a necessidade de tratamento do paciente (KATILA, 2016). Além de envolver uma avaliação clínica e histórico reprodutivo (AMORIM et al., 2016) Os métodos de exame podem ser classificados em grupos: Exames clínico e laboratoriais. O exame

clínico inclui palpação retal e ultrassonografia transretal, exame transvaginal digital ou com espéculo, inspeção da região perineal e corrimento vaginal, além de realização da vaginoscopia. Já os exames laboratoriais envolvem biópsia, citologia e cultura uterina (KATILA, 2016).

1.3.1 Cultura microbiológica

As baixas taxas de prenhez na espécie equina podem estar associadas ao crescimento de microrganismos no lúmen uterino e a cultura microbiológica pode fornecer informações valiosas nos casos de endometrites infecciosas (CANISSO et al., 2016), se tornando uma importante ferramenta para o diagnóstico e tratamento. O material necessário para a realização da cultura endometrial deve ser sempre coletado antes de qualquer outro procedimento uterino ou vaginal para que sejam identificados potenciais contaminantes. A amostra pode ser colhida por meio de *swab*, lavado de baixo volume e biópsia (BAIN, 1966; BALL et al., 1988; NIELSEN, 2005; NIELSEN et al., 2010; MØLLER NIELSEN et al., 2012). Após a colheita, a amostra deve ser processada ou armazenada em meio de transporte, sendo mantida sob refrigeração até sua chegada ao laboratório ou inoculada adequadamente em meio de cultura. Além disso, a identificação dos microrganismos pode ser feita por meio de testes bioquímicos, proteínas biológicas ou sequenciamento genético. A estimativa do crescimento bacteriano pode ser feita pela contagem das colônias nas placas, classificando-se como: ausência de crescimento (sem colônias), crescimento muito discreto (até 2 colônias na primeira semeadura), discreto (entre 3 e 5 colônias na primeira semeadura), moderado (mais de 5 colônias na segunda semeadura) e intenso (mais de 5 colônias na terceira semeadura) (CHRISTOFFERSEN et al., 2012; FERRIS, 2016).

1.3.2 Citologia Uterina

Por meio da citologia uterina se torna possível a identificação de células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, os quais migram para o endométrio em resposta a um estímulo inflamatório. Os esfregaços adquiridos com a escova citológica (*cytobrush*) apresentam uma quantidade celular maior em comparação com o *swab* de neutrófilos e células epiteliais, (WALTER et al., 2012).

A técnica de citologia uterina utilizando uma escova ginecológica é realizada após a fixação destes a uma pinça de citologia, metálica ou plástica descartável. Estes dispositivos incluem um mandril, que facilita a extensão da escova. Para aplicar a técnica, a extremidade da haste deve ser coberta com o dedo polegar, introduzindo-se o equipamento na vagina até

localizar a cérvix, e, em seguida, direcionando o instrumento até a superfície do lúmen uterino. Uma vez introduzido, a haste deve ser posicionada no corpo do útero, expondo a escova e girando-a continuamente por três vezes para colher o material. A escova deve ser recolhida para dentro da haste com a ajuda do mandril acoplado, sendo, então, removida do trato genital da égua (OVERBECK et al., 2011).

A técnica de lavagem uterina de baixo volume, acompanhada de sedimentação e realizada por meio de um sistema fechado de três vias, utilizando um cateter de colheita de embrião. O procedimento recomenda-se a infusão de cerca de 100 mL de solução fisiológica, seguida de massagem uterina, visando facilitar a recuperação do volume da solução administrada. O volume recuperado deve ser coletado em um tubo graduado de 50 mL para a centrifugação e sedimentação do conteúdo (DASCANIO & MCCUE, 2014).

1.3.3 Biópsia Uterina

A biópsia envolve a colheita de um pequeno fragmento do corno uterino, utilizando-se uma pinça uterina apropriada; esse fragmento é então fixado em formol, para que possa ser enviado posteriormente ao laboratório de histopatologia, submetido a análises detalhadas (BUCZKOWSKA et al., 2014). A histopatologia permite uma análise detalhada dos tecidos uterinos, possibilitando a identificação de fibrose, que afeta diretamente a capacidade do útero de manter uma gestação até o fim. Dessa forma, esse método é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de endometrite crônica em éguas (LEBLANC, 2010).

1.4 Tratamento

O tratamento da endometrite tem como objetivo modular o processo inflamatório e, caso houver, a infecção local para proporcionar um ambiente uterino saudável para a concepção e gestação (LEBLANC et al. 2009). A terapêutica adotada inclui a convencional, com lavagem uterina com solução ringer-lactato associada a fármacos ecbólicos, além da utilização de antimicrobianos. Entretanto devido ao número de insucessos, a utilização de terapias integrativas, isoladas ou associadas com a terapia convencional, têm mostrado resultados positivos (ÁVILA et al., 2022).

1.4.1 Terapias convencionais

1.4.1.1 Lavagem uterina

A lavagem uterina visa neutralizar agentes e remover detritos resultantes de inflamação ou infecção uterina, promovendo sua expulsão do útero da égua, assim como espermatozoides mortos do lúmen, caso haja a permanência dos mesmos pode acabar por prejudicar o embrião após a cobertura e para os espermatozoides antes da cobertura; este procedimento permite a remoção de detritos como microrganismos e neutrófilos degenerados, além de estimular a contratilidade uterina. Ao causar leve irritação, a técnica também promove o recrutamento de novos neutrófilos (KNUTTI et al., 2000; BRINSKO et al. 2011; COCCHIA et al. 2012), ela é recomendada em casos de acúmulo excessivo de fluídos uterinos (BRINSKO et al., 2003).

Para realização da lavagem, as soluções cristaloides mais usadas são: ringer com lactato e solução salina a 0,9%, porém estas soluções podem ser associadas a outras antissépticas e aditivos para romper o biofilme com os mucolíticos sendo eles: Na-cestilcisteína, dimetilsulfóxido (EISENBERG & DOBROGOSZ, 1967; CANISSO et al., 2020). O procedimento pode ser feito antes da cobertura, e/ou quatro horas após, pois assim houve tempo o suficiente para que o esperma atinja as tubas uterinas onde acontece a fecundação do oócito (FIALA et al., 2007).

1.4.1.2 Agentes ecbólicos

Agentes ecbólicos são compostos empregados para induzir as contrações uterinas, facilitando a expulsão de conteúdo intrauterino, como líquidos, tecidos ou microrganismos pela cérvix e pela drenagem linfática; essas substâncias são frequentemente utilizadas no manejo reprodutivo e no tratamento de condições como a endometrite em éguas (CADARIO et al., 1995). Um dos principais agentes ecbólicos utilizados para o tratamento da endometrite em éguas é a ocitocina, um hormônio natural que quando administrado por via exógena promove contrações uterinas facilitando assim a expulsão de fluidos ou resíduos que encontram-se retidos no lúmen uterino; e sua administração ocorre normalmente uma hora antes da cobertura, quatro horas após a cobertura e 72 horas após a ovulação (BRINSKO et al., 1991).

1.4.1.3 Antibióticos

A antibioticoterapia é realizada a partir do resultado da cultura e sensibilidade do patógeno, é comum ser usados para tratamento medicamentos à base de penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina (LIU, et al. 2008). Os mecanismos que tornam

as bactérias mais resistentes ao antibiótico integram a modificação do sítio de ligação celular fazendo com que ligação celular atrapalhe a ligação do antibiótico através da síntese de enzimas que suportam o agente antimicrobiano; causando o *down regulation* ou erradicação das purinas nas transmembranas, sendo por onde os principais ativos dos fármacos entram na célula, gerando eliminação dos medicamentos usados por bombas de efluxo (GIGUÈRE, 2013).

É necessário a confirmação da existência de bactérias através do seu isolamento e a realização de uma TSA, de modo que a administração do antibiótico seja certa para cada caso. Todavia, não é viável seguir um padrão, pois, nem sempre isso é possível, dessa forma, no caso de endometrite o uso de antibióticos de amplo espectro é feito a partir de bactérias comumente isoladas (LEBLANC, 2010). A administração destes fármacos pode ser realizada através das vias sistêmicas ou por infusão intrauterina, vale ressaltar que é de suma importância que seja respeitada a via recomendada de administração de cada produto. Tendo como exemplo a enrofloxacin que caso administrada de forma incorreta no lúmen uterino pode acarretar um quadro de necrose neste órgão (RODRIGUEZ et al., 2012).

1.4.1.4 Vulvoplastia

O procedimento cirúrgico de vulvoplastia é realizado no intuito de proteger o trato reprodutivo das éguas, evitando pneumovagina e contaminação fecal. Em fêmeas da espécie equina quando submetidas a avaliação clínica ginecológica, onde a conformação perineal e a avaliação da genitália interna, revelam problemas relacionados a contaminação da mesma por disfunções de conformação; a execução deste procedimento é recomendada para prevenir infecções, e, conseqüentemente, aumentar a fertilidade (SEABAUGH & SCHUMACHER, 2014)

1.4.2 Terapias integrativas

1.4.2.1 Agentes Imunomoduladores

Os tratamentos que modulam ou suprimem a resposta imune são utilizados para reduzir a inflamação observada após a introdução do sêmen no lúmen uterino. A imunomodulação pode ajudar a restaurar a homeostase ao diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando assim a taxa de gestação (BESSA et al., 2022).

304 Como uma alternativa pode ser feito o uso de anti-inflamatórios não esteroidais COX-
305 2 seletivos. Estudos demonstraram que o Firocoxib é eficaz em mitigar a resposta inflamatória
306 após a cobertura, sem afetar as taxas de ovulação (FRISO et al., 2019).

307 A administração de corticosteroides, como a dexametasona e a prednisolona, é uma
308 prática comum para reduzir a resposta inflamatória em éguas suscetíveis à endometrite. Estudos
309 indicam que o uso de dexametasona diminui as citocinas pró-inflamatórias e suprime os
310 mediadores da inflamação, além de aumentar as interleucinas anti-inflamatórias. No entanto, o
311 uso repetido pode suprimir o hormônio luteinizante e reduzir a taxa de ovulação. Além disso,
312 os esteroides bloqueiam as vias de inflamação da ciclooxigenase e da 5-lipoxigenase, impedindo
313 a produção de leucotrieno B, um quimiotático dos neutrófilos, o que pode aumentar a
314 suscetibilidade a infecções bacterianas. Portanto, a seleção cuidadosa das éguas candidatas ao
315 uso de corticosteroides é crucial, pois o uso inadequado em casos de endometrite bacteriana
316 pode agravar a infecção. Ecograficamente, éguas tratadas com corticosteroides apresentam
317 redução do grau de edema uterino e do volume de fluido intrauterino, frequentemente com
318 menor ecogenicidade (BESSA et al., 2022).

319 320 1.4.2.2 Plasma Rico em Plaquetas

321
322 O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas alcançado através
323 de uma metodologia simples e com um bom custo-benefício, permitindo alcançar altas
324 concentrações de fatores de crescimento com propriedades regenerativas, para alcançar o efeito
325 desejado, é essencial concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ l (VENDRUSCULO,
326 2012).

327 A aplicação intrauterina de 20mL de PRP, realizada 24 horas antes e 4 horas após a
328 inseminação, mostrou resultados promissores no tratamento da endometrite. Houve uma
329 diminuição significativa dos polimorfonucleados na citologia, indicando uma redução da
330 resposta inflamatória. Além disso, observou-se um aumento na taxa de concepção,
331 evidenciando a eficácia do PRP na melhora da fertilidade. Outro benefício notado foi a
332 diminuição da expressão da enzima COX-2, associada à inflamação, sugerindo que o PRP
333 também possui propriedades anti-inflamatórias efetivas (SEGABINAZZI et al., 2017).

334 335 1.4.2.3 Células Tronco

336
337 As células-tronco mesenquimatosas (MSC) são vistas como um potencial opção de
338 tratamento para a endometrite em éguas. Elas têm a capacidade de gerar uma resposta

imunomoduladora, aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias e demonstrarem propriedades antimicrobianas (RINK et al. 2018). As células-tronco podem ser classificadas em embrionárias, que são extraídas da massa celular interna de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, e somáticas, presentes em tecidos diferenciados de fetos, recém-nascidos ou adultos (FRIEL et al., 2005).

Na medula óssea existe um tipo de célula-tronco, conhecida como célula-tronco mesenquimal (CTM). Essas células têm uma notável capacidade de renovação e podem se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Sob certas condições, as CTMs podem originar células de diversos tecidos, como tecido adiposo, cartilagens, ossos, músculos (CONRAD & HUSS, 2005) e em células endometriais (DU & TAYLOR, 2007).

Por causa de suas características distintas de diferenciação, bem como suas propriedades imunomoduladoras e de migração, as células estromais mesenquimatosas do endométrio têm o potencial de fornecer uma rica fonte de células terapêuticas para a regeneração de tecidos (RINK et al., 2018), reduzem a infecção relacionada à inflamação e à fibrose e, ao modular a resposta imunológica inata, recrutam a ação de neutrófilos e monócitos, facilitando a fagocitose de bactérias (JOHNSON et al., 2017).

Em éguas resistentes à endometrite, a aplicação de células-tronco mesenquimatosas (MSC) reduziu a contagem de neutrófilos e aumentou a produção de citocinas anti-inflamatórias 6 horas após a inseminação artificial (FERRIS et al, 2014). Em contrapartida a aplicação de meio condicionado por células-tronco em éguas suscetíveis à endometrite, 24 horas antes da inseminação artificial, minimizou o acúmulo de fluido intrauterino após a cobertura, modulou a resposta inflamatória induzida pelo sêmen e reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias (TONGU et al., 2021).

1.4.2.4 Ozonioterapia

O ozônio (O₃) é um gás composto por três moléculas oxigênio (O₂), altamente volátil, com grande poder oxidativo, a ozonioterapia utiliza o gás (O₃) para tratar derivadas condições, possuindo efeitos germicidas, analgésicos, imunomoduladores e promotor de cicatrização tecidual. Sua aplicação é versátil, podendo ser administrado por diferentes vias, com exceção das vias respiratórias e intravenosas direta (MARQUES et al, 2017).

Na reprodução equina foram realizados estudos que apresentaram resultados satisfatórios na utilização de ozonioterapia em éguas com falhas reprodutivas (ÁVILA et al., 2022). A realização deste procedimento pode reduzir a necessidade de utilização de antimicrobianos, tendo baixo custo e sem liberação de resíduos no meio ambiente

(BRINSKO et al., 2011; ÁVILA et al., 2022). A utilização de ozônio em éguas senis e multíparas é uma terapia promissora, pois comprovadamente possui um alto potencial de regeneração vascular. Isso ocorre através da estimulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular, um potente estimulador da angiogênese que atua diretamente na coordenação do processo de reepitelização (VALACCHI et al., 2011; ESTELLER-VICO, 2012; KIRKIL et al., 2016).

Segundo FERREIRA et al. (2021) a ozonioterapia possui grande potencial para uso na reprodução assistida de éguas. Como não provoca alterações degenerativas ou inflamatórias significativas no tecido endometrial, a insuflação uterina com a mistura gasosa O₂-O₃ é considerada uma terapia segura para estimular a angiogênese local.

A administração de ozônio no ambiente uterino de éguas pode induzir um estresse oxidativo controlado, efeito este que estimula a atividade de processos biológicos e a expressão de genes responsáveis pela produção de proteínas e enzimas antioxidantes, como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (TSUZUKI et al., 2016; MERHI et al., 2019; ÁVILA et al., 2022)

Presume-se que a inflamação seja reduzida após tratamentos com ozônio devido à inibição de citocinas pró-inflamatórias e da fosfolipase A2, juntamente com a estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 e o fator de necrose tumoral β1 (JANIC et al., 2003; ÁVILA et al., 2022)

A utilização da ozonioterapia em equinos pode ser feita por via sistêmica, retal, venosa, muscular e auto-hemoterapia, outra forma de aplicação local usando o ozônio pode ser por vias subcutâneas, intravaginal, intrarticular, subfacial, peritendinosa, epidural, intramuscular e intrauterina (VIGLINO, 2008). De acordo com FERREIRA et al. (2021) ao realizar o preenchimento do lúmen uterino com O₃ incentiva a proliferação celular sem apresentar alterações significativas ao endométrio equino. Os resultados apresentados pelo grupo de pesquisa no qual ele faz parte, corroboram com a seguinte afirmação: Indicando aumento do número de vasos sanguíneos e no grau de vascularidade endometrial, observou-se que após consecutivas insuflações uterinas com mistura gasosa contendo baixa ou moderada concentração de ozônio. Assim como, a morfometria tendo resultados positivos feitos na terapia local, não mostrando alterações significativas em sua morfologia.

A interação do O₃ com os ácidos graxos poliinsaturados origina compostos de peroxidação que se propagam nas células do sistema imune. Dessa forma, a ozonioterapia modula a sinalização celular e estimula o sistema imune (CALISKAN et al., 2011).

O ozônio possui um forte efeito germicida, capaz de inativar bactérias, vírus e fungos, o que é particularmente útil na prevenção e tratamento de infecções uterinas. Em um estudo

realizado por Thanomsub et al. (2002) expondo bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e bactérias gram-positivas como por exemplo *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, a 0,167 mg/min/L de ozônio, resultando em desfiguração da membrana celular, causando perda de conteúdo intracelular e a morte da bactéria. Gulmen et al., 2013 continuou os estudos na área comprovando que a atividade bacteriana em animais tratados com ozônio diminuiu significativamente, atingindo bons resultados, mas ao realizar a associação de O₃ com vancomicina (40mg/kg) apresentou resultados ainda melhores.

O uso do ozônio no sistema reprodutivo de éguas tem mostrado um grande potencial em vários aspectos ligados à saúde do útero e à fertilidade. A aplicação de ozônio diretamente no útero tem sido investigada como método para tratar doenças uterinas como o caso da endometrite, retenção de placenta, vaginite, urovagina em ruminantes. (SAMARDZIJA et al. 2017).

Ademais, a ozonioterapia tem a capacidade de aprimorar as condições do ambiente uterino, tornando-o menos favorável para a proliferação de patógenos. A aplicação de uma preparação comercial de espuma de ozônio no ambiente endometrial demonstrou seu potencial frente a diminuição da carga bacteriana e inflamação no útero, sugerindo assim que o ambiente uterino se tornaria mais adequado para a concepção e a continuidade da gestação (DONATO et al., 2023).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila ACA, Diniz, NC, Serpa RT, Chaves MMBC, Viu MAO, Oliveira, RA.** Effectiveness of ozone therapy in the treatment of endometritis in mares. J Equine Vet Sci 2022: 112, 103900. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103900>
- Amorim MD, Gartley CJ, Foster RA, Hill A, Scholtz EL, Hayes A, Chenier TS.** Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of equine endometritis. J Equine Vet Sci 2016: 44, 54-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.10.012>
- Bain AM.** The role of infection in infertility in the thoroughbred mare. Vet Rec 1966: 78, 168-173. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.78.5.168>
- Ball BA, Shin SJ, Patten VH, Lein DH, Woods GL.** Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. Theriogenology, 1988: 29, 1269–1283. DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90007-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90007-6).

442 **Bessa de Carvalho IGH, Cardoso M, Pias G, Silva C, Conceição S, Sena Lopes J, Branco**
 443 **S, Queiroga C, Bettencourt E.** (2022). **DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA**
 444 **ENDOMETRITE NA ÉGUA**, Universidade de Évora. ISBN: 978-972-778-299-4

445 **Brinsko SP, Rigby SL, Varner DD, Blanchard TL.** A practical method for recognizing mares
 446 susceptible to post-breeding endometritis. In: Proc Am Assoc Equine Pract 2003: 49, 363-365.
 447 Corpus ID: 3397872

448 **Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL.** The effect of uterine lavage performed four hours
 449 post insemination on pregnancy rate in mares. Theriogenology 1991: 35, 1111-1119. DOI:
 450 [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90358-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90358-K)

451 **Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman**
 452 **D.** Manual of equine reproduction. Third ed. Mosby, Missouri, 6-7 3rd edition, Mosby Elsevier,
 453 59-68, 2011.

454 **Beltaire KA, Cheong SH, Coutinho da Silva MA.** Retrospective study on equine uterine
 455 fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999-2011). Equine Vet J Suppl 2012:
 456 44, 84-87. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00608.x>.

457 **Cadario ME, Thatcher MJD, Leblanc MM.** Relationship between prostaglandin and uterine
 458 clearance of radiocolloid in the mare. Biol Reprod 1995: 52, 495-500. DOI:
 459 https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.495.

460 **Canisso IF, Segabinazzi LGTM, Fedorka CE.** Persistent Breeding-Induced Endometritis in
 461 Mares-a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and
 462 Pathobiology. Int J Mol Sci, 2020: 21, 1432. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21041432>.

463 **Canisso IF, Stewart J, Coutinho da Silva MA.** Endometritis: Managing Persistent Post-
 464 Breeding Endometritis. Vet Clin Equine 2016; 32, 465-480. DOI:
 465 <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.004>.

466 **Christoffersen M, Woodward EM, Bojesen AM, Petersen MR, Squires EL, Lehn-Jensen**
 467 **H, Troedsson MH.** Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory
 468 response to induced infectious endometritis in susceptible mares. Theriogenology 2012: 5,
 469 991–1004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.016>

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

474 **Conrad C, Huss R.** Adult Stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery.
 475 Journal of Surgical Research 2005: 124, 201-208. DOI:
 476 <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.09.015>.

477 **Diel de Amorim M, Gartley CJ, Foster RA, Hill A, Scholtz EL, Hayes A, Chenier TS.**
 478 Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume
 479 lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of Equine Endometritis. J. Equine
 480 Vet. Sci 2015: 44, 54-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.10.012>.

481 **Donato GG, Appino S, Bertero A, Poletto ML, Nebbia P, Robina P, Varello K; Bozzetta**
 482 **E, Vincenti L, Nervo T.** Safety and effects of a commercial ozone foam preparation on
 483 endometrial environment and fertility of mares. J.Equine Vet. Sci 2023: 121, 104222. DOI:
 484 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104222>

485 **Du H, Taylor HS.** Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and
 486 endometriosis. Stem cells 2007: 25, 2082-2086. DOI: [https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0828)
 487 [0828](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0828).

488 **Esteller-Vico A, Liu IK, Couto S.** Uterine vascular degeneration is present throughout
 489 the uterine wall of multiparous mares. Colinearity between elastosis, endometrial grade, age
 490 and parity. Theriogenology 2012: 78, 1078-1084. DOI:
 491 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.014>.

492 **Eisenberg RC, Dobrogosz WJ.** Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol
 493 1967:93, 941-949. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.93.3.941-949.1967>.

494 **Ferreira JC, Amaral RS, Cardoso LM, Marchiό SP, Rodrigues MA, Alves CEF, Meira**
 495 **C.** Endometrial angiogenesis induced by uterine insufflation with an oxygen-ozone gas
 496 mixture in mares. Reprod Domest Anim 2021: 56, 1176-1183. DOI:
 497 <https://doi.org/10.1111/rda.13958>.

498 **Ferreira JC, Amaral RS, De Souza Cintra, Bianca.** Ozonioterapia no tratamento auxiliar
 499 de éguas inférteis: Potencial angiogênico e antimicrobiano. Rev Bras Reprod Anim 2021:45,
 500 482-488. DOI: <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.064>.

501 **Ferris RA.** Endometritis: Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. Vet Clin North Am
 502 Equine Pract 2016: 32, 481–498. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.001>.

503 **Ferris RA, Frisbie DD, Mccue PM.** Use of mesenchymal stem cells or autologous
 504 conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares.
 505 Theriogenology 2014: 82, 36–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.015>.

506 **Ferris, RA.** Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical
 507 perspective. Rev. Bras. Reprod. Anim 2017: 41 74-80.

508 **Fiala SM, Pimentel CA, Mattos ALG, Grefory RM, Mattos RC.** Effect of sperm numbers
 509 and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare.
 510 Theriogenology 2007: 67 556-562. DOI:
 511 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.005>.

512 **Friel E, Sar S, Mee JP.** Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and
513 signalling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005: 57 1894- 1903. DOI:
514 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.08.002>.

515 **Friso AM, Segabinazzi LGTM, Cyrino M, Correal SB, Freitasdell'Aqua CP, Teoro do**
516 **Carmo M, Dell'Aqua JÁ, Miró J, Papa FO, Alvarenga MA.** Perioovulatory administration
517 of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response
518 in mares. *Theriogenology* 2019: 138, 24-30. DOI:
519 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.045>

520 **Gulmen ST, Kurtoglu I, Meteoglu S, Kaya AND, H. Okutan.** Ozone therapy as an adjunct
521 to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
522 mediastinitis. *J. Surgical Res.* 2013: 185, 64-69. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.05.085>

523 **Heil BA, Paccamonti DL, Sones JL.** Role for the mammalian female reproductive tract
524 microbiome in pregnancy outcomes. *Physiol Gen* 2019: 51 390-399. DOI:
525 <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00045.2019>.

526 **JANIC B, Umstead TM, Phelps DS, Floros J.** An in vitro cell model system for the study of
527 the effects of ozone and other gaseous agents on phagocytic cells. *J. Immunol* 2003: 272, 125–
528 134. DOI: 10.1016/s0022-1759(02)00440-4

529 **Katila, T.** Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reproductive Biology.*
530 2016: 198, 8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2016.06.002>

531 **Kirkil C, Yigit MV, Özercan IH, Aygen E, Gulturk B, Artas G.** The effect of ozonated olive
532 oil on neovascularization in an experimental skin flap model. *Advances in skin & wound care,*
533 2016: 29, 322-327. DOI: 10.1097/01.ASW.0000484172.04260.46

534 **KENNEY, R.M.** Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by
535 biopsy, with a note on early embrionic death. *J. Am. Vet. Med. Assocv* 1978:172, 241-262.
536 PMID: 621166

537 **Knutti B, Pycock JF, Van Der Weijden GC, Kupfer U.** The influence of early postbreeding
538 uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding.
539 *Equine Vet Educ,* 2000: 12, 267-270. DOI: [https://doi.org/10.1111/j.2042-](https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2000.tb00056.x)
540 [3292.2000.tb00056.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2000.tb00056.x)

541 **Leblanc MM, Mckinnon AO.** Breeding the problem mare. In: MCKINNON A.O., SQUIRES
542 E.L., VAALA W.E., VARNER, D.V., *Equine Reproduction*, 2^a ed., U.K: Wiley-Blackwell,
543 2011. 3056p.

544 **Leblanc MM.** Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and postmating-
545 induced endometritis in the mare. *Reproduction in Domestic Animals*, 2010:45, 21–27. DOI:
546 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x>

547 **Liu IKM, Troedsson MHT.** The diagnosis and treatment of endometritis in the mare:
548 Yesterday and today. *Theriogenology*, 2008: 70, 415-420. DOI:
549 10.1016/j.theriogenology.2008.05.040

550 **Merhi Z MD HCLD, Garg B, Moseley-LaRue R, Moseley AR, Smith AH, Zhang J.** Ozone
551 therapy: A potential therapeutic adjunct for improving female reproductive health. *Med. Gas*
552 *Res.* 2019; 9, 101–105. DOI: 10.4103/2045-9912.260652

553 **Moller NJ, Nielsen FD, Petersen MR.** Diagnosis of equine endometritis-Microbiology,
554 cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility. *Pferdeheilkunde*,
555 2012; 28, 8 13.

556 **Morris LH, Mccue PM, Aurich C.** Equine endometritis: a review of challenges and new
557 approaches. 2020; 160, 95-110. DOI: [10.1530/REP-19-0478](https://doi.org/10.1530/REP-19-0478)

558 **Nascimento Júnior JAA, Oliveira Filho EF, Filho EF, Melo AGP, Correia MTS, Carneiro**
559 **GF.** Fungal characterizati-on and biofilm formation in mares with endometritis. *Rev Bras*
560 *Reprod Anim*, 2021; 45, 33- 38. DOI:[10.21451/1809-3000.RBRA2021.004](https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.004)

561 **Nielsen JM.** Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab
562 and biopsy. *Theriogenology*, 2005: 64, 510–518. DOI:
563 [10.1016/j.theriogenology.2005.05.034](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.034).

564 **Nielsen JM, Troedsson MH, Pedersen MR, Lehn-Jensesn H.** Diagnosis of Endometritis in
565 the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the Endometrium:
566 Comparison of Results Obtained by Swabs and Biopsies. *J. Equine Vet. Sci.*, 2010; 30,27–30.
567 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2009.11.006>[Get rights and content](#)

568 **Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W.** Comparison of three diagnostic methods to identify
569 subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, 2011; 75, 1311-1318. DOI:
570 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.002>

571 **Rink BE, Beyer T, Frecnh HM, Watson E, Aurich C, Donadeu FX.** The fate of
572 autologous endometrial mesenchymal stromal cells after application in the healthy equine
573 uterus. *STEM CELLS DEV*, 2018: 27, 1046-1052. DOI:
574 <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0056>

575 **Seabauch KA, Schumacher J.** Urogenital surgery performed with the mare standing. *Vet.*
576 *Clin. North Am. Equine Pract*, 2014; 30, 191-209. DOI:
577 <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2013.11.007>

578 **Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho AM, Dell'Aqua JRJA, Miró J, Papa**
579 **FO, Alvarenga MA.** Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-
580 2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with plateletrich

581 plasma before and after AI. Theriogenology, 2017:104, 120-126. DOI:
582 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.007>

583 **Samardzija M, Turk R, Sobiech P, Valpotic H, Harapin I, Gracner D, Duricic D.**
584 Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: a review. Vet.
585 Arh., 2017:87, 363-375. DOI: <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.160119a>

586 **Stout, TAE.** Fungal endometritis in the mare. Pferdeheilkunde, 2008: v. 24, n. 1, p. 83. DOI:
587 10.21836/PEM20080117

588 **Thomassian A.** Enfermidades dos cavalos. 4. ed. São Paulo: Varela editora e livraria, 2005.

589 **Tongu EAO, Segabinazzi LGTM, Alvarenga ML, Monteiro A, Papa FO, Alvarenga**
590 **MA.** Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm
591 parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares.
592 Theriogenology 2021: 169,1–8. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2021.03.019](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.019)

593 **Troedsson MHT.** Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare.
594 Theriogenology 1999: 52, 461–71. DOI: 10.1016/S0093-691X(99) 00143-0.

595 **Tsuzuki, N, Endo Y, Kikkawa L, Korosue K, Kaneko Y, Kitauchi, A., ... & Torisu, S.**
596 Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses.
597 JVMS 2016: 77, 1647–1650. DOI: [10.1292/jvms.15-0225](https://doi.org/10.1292/jvms.15-0225)

598 **Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V, Travagli V.** Ozonated
599 sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. Wound Repair and Regeneration
600 2011: 19, 107-115. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00649.x>

601 **Vendrusculo CP, Watanabe MJ, Maia L, Carvalho AM, Alves ALG.** Plasma rico em
602 plaquetas: Uma nova perspectiva terapêutica para medicina equina. Veterinária e Zootecnia,
603 2012: 19, 33-43. ISSN 0102-5716

604 **Viglino GC.** Ozonioterapia Aplicada a Equinos. São Paulo: Associação Brasileira de
605 Ozonioterapia, p.6, 2008.

606 **Walter J, Neuberg KP, Failing K, Wehrend A.** Cytological diagnosis of endometritis in the
607 mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. Anim.
608 Reprod. Sci., 2012: 132, 178-186. DOI:
609 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.012><https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.012>

610 .012

611 **Watson ED.** Post-breeding endometritis in the mare. Anim Reprod Sci 2000: 60-61, 221–32.
612 DOI: [10.1016/s0378-4320\(00\)00110-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00110-x)

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA OZONIOTERAPIA NA INFLAMAÇÃO, CONTAMINAÇÃO UTERINA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE ÉGUAS.

RESUMO

A ozonioterapia tem mostrado resultados encorajadores no tratamento de inflamações e infecções uterinas em éguas. A administração da ozonioterapia intrauterina auxilia na diminuição da carga microbiana e na modulação da resposta inflamatória, criando um ambiente uterino mais propício à reprodução. Este estudo investigou os efeitos da ozonioterapia no tratamento da inflamação e infecção uterina de éguas subférteis. As éguas (n=8) foram avaliadas por três ciclos estrais consecutivos denominados, Controle (G1), tratamento (G2) e pós-tratamento (G3), respectivamente. Amostras endometriais foram coletadas por biópsia uterina no início e ao final do experimento (controle e pós-tratamento, respectivamente). Citologias uterinas foram realizadas nos 3 ciclos estrais nos momentos a seguir: indução da ovulação (0h), 48h, 72h e 96h. Os parâmetros utilizados para a avaliação da efetividade do tratamento foram a cultura microbiológica, a citologia e biópsia uterina do material coletado. A cultura uterina foi realizada em 0h e 96h. Para o grupo tratamento (G2) houve insuflação uterina com mistura de gás O₂-O₃ contendo 40 µg O₃ mL⁻¹ por 10 minutos. Não houve inseminação nesse ciclo. A colheita de embrião foi realizada 8 dias após a ovulação. A infusão intrauterina do gás O₃ se mostrou eficiente na modulação do processo inflamatório uterino onde, a média de neutrófilos apresentados na primeira citologia uterina foi maior do que a apresentada após o tratamento, limitando o crescimento bacteriano e diminuindo a proliferação de microrganismos. Os resultados de biópsia uterinas obtidas demonstram que não há nenhum malefício da infusão direta do gás ozônio no ambiente uterino.

Palavras-chave: bactérias, endometrite, equinos, fertilidade em medicina-integrativa.

**EFFECTS OF OZONE THERAPY ON INFLAMMATION, UTERINE
CONTAMINATION AND EMBRYO PRODUCTION IN MARES.**

ABSTRACT

Ozone therapy has shown encouraging results in the treatment of uterine inflammation and infections in mares. Intrauterine ozone therapy helps to reduce the microbial infection and modulate the inflammatory response, creating a better uterine environment. This study investigated the effects of ozone therapy in the treatment of uterine inflammation and infection in subfertile mares. Mares (n=8) were evaluated for three consecutive estrous cycles, named Control (G1), treatment (G2) and post-treatment (G3), respectively. The parameters used to evaluate the effectiveness of the treatment were microbiological culture, cytology, and uterine biopsy of the collected material. A uterine biopsy was performed in all mares at the beginning of the experiment (control) and a second biopsy at the end (post-treatment). Uterine cytologies were performed in all mares, in the 3 cycles at the following times: ovulation induction (0h), 48h, 72h and 96h after induction. Uterine culture was performed at the time of induction (0h) and 96h after ovulation induction. For the treatment group (G2), there was uterine insufflation with an O₂-O₃ gas mixture containing 40 µg O₃ mL⁻¹ for 10 minutes. There was no insemination in this cycle. Embryo collection was performed 8 days after ovulation. Intrauterine infusion of O₃ gas proved to be efficient in modulating the uterine inflammatory process, where the average number of neutrophils presented in the first uterine cytology was higher than that presented after treatment, limiting bacterial growth. The results of uterine biopsies obtained demonstrate that there is no harm from direct infusion of ozone gas into the uterine environment.

Keywords: bacteria, endometritis, equine, fertility and integrative-medicine.

1. INTRODUÇÃO

A endometrite, inflamação do endométrio acompanhada ou não de infecção local, é a principal causa de subfertilidade e a terceira doença mais comum em éguas. Clinicamente, as éguas são classificadas como suscetíveis ou resistentes à endometrite persistente pós cobertura (PBIE), com base na capacidade de eliminar essa inflamação ou infecção em até 48 horas após a reprodução. Éguas suscetíveis, que têm dificuldade em resolver a inflamação, podem apresentar uma má conformação vulvar e um útero pendular (CANISSO et al., 2020).

A inflamação uterina é uma resposta fisiológica que ocorre posterior a inseminação artificial ou a monta natural, com o objetivo de eliminar o excesso de sêmen e microrganismos presentes no lúmen uterino (TROEDSSON; LIU; CRABO, 1998). No entanto, se essa inflamação persistir por mais de 24 horas após a cobertura ou IA, ela passa a ser considerada patológica, e a égua é classificada como suscetível à endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) (TROEDSSON et al., 2001).

Durante o processo reprodutivo o ambiente uterino das éguas é submetido constantemente a exposição de uma gama de microrganismos seja no momento da cobertura, seja através da aplicação das biotecnologias da reprodução. Troedsson (1999) classifica esta patologia de acordo com os sinais clínicos apresentados pelas éguas que podem ser divididas em dois grupos, resistentes ou susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura, já LeBlanc (2010) classifica a endometrite em três categorias: infecção aguda, infecção crônica e endometrite persistente pós-cobertura.

Na área de reprodução animal, pesquisas com equinos indicam resultados positivos do uso da ozonioterapia em éguas com problemas reprodutivos. A ozonioterapia pode reduzir a necessidade de antimicrobianos, sendo uma técnica de baixo custo que não libera resíduos nem contamina o meio ambiente (BRINSKO et al., 2011). Sua ação antimicrobiana pode ser relevante no controle da carga microbiana associada à inflamação, enquanto a melhora da circulação sanguínea facilita a entrega adequada de oxigênio e nutrientes aos tecidos inflamados (CALDERON et al., 2016; ÁVILA et al., 2022).

A utilização da infusão direta do gás ozônio no ambiente uterino de éguas com diagnóstico de endometrite vem se mostrando como um tratamento promissor devido a apresentação de bons resultados já demonstrados por este grupo de pesquisa anteriormente (ÁVILA et al., 2022), além de sua fácil aplicação a campo com garantia de segurança da administração, onde se consegue controlar muito bem as doses administradas, eficientes no controle da inflamação local e controle do crescimento bacteriano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob protocolo SEI n. 23106.069339/2022-61.

2.1 Animais

Oito éguas mestiças com idade entre 7 e 21 anos ($13,5 \pm 6,52$) e com peso médio de 360kg foram selecionadas com base em seu histórico reprodutivo. Todas as éguas foram classificadas como subférteis uma vez que apresentaram taxa de recuperação embrionária abaixo de 40%, sem nunca ter apresentado sinais clínicos de endometrite e nunca receberam tratamento prévio para esta condição. Os animais foram mantidos em criação extensiva em pasto de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*), sal mineral (40g/cabeça/dia) e água *ad libitum* na estação experimental Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (FAL), Brasília-DF.

O sêmen foi colhido de 1 garanhão da raça Quarto-de-Milha localizado na FAL, com auxílio de vagina artificial, em manequim artificial (FREITAS et al.,2015). Após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto ao volume, aspecto (cor e densidade), e cinética espermática pelo CASA (Androscope), viabilidade espermática por coloração de eosina-nigrosina, e morfologia espermática por metodologia de câmara úmida de acordo com os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Setup do Androscope: Frame rate da câmera 54hz, frames por análise 30, espermatozoides móveis com HAC maior ou igual a 0,05 ou VSL maior ou igual a 5. Espermatozoides progressivos com STR maior ou igual a 0,75 e VAP maior ou igual a 120.

2.2 Delineamento experimental

O controle folicular das éguas foi realizado por palpação retal e ultrassonografia transretal em dias alternados até a detecção de um folículo ≥ 35 mm associado a edema uterino, sendo a ovulação induzida mediante a aplicação endovenosa de 2500 UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana). As éguas foram inseminadas 24h após a indução da ovulação, com deposição do sêmen no corpo do útero nos ciclos G1 e G3.

Todas as fêmeas foram avaliadas por três ciclos estrais consecutivos: Ciclos Controle, Tratamento e Pós-tratamento (G1, G2 e G3, respectivamente). Biópsias uterinas foram realizadas imediatamente antes de do momento 0h de cada grupo em G1 e após em G3.

Citologias uterinas foram realizadas em todas as éguas e nos três ciclos imediatamente antes do tratamento indutor de ovulação (0h), 48h, 72h e 96h. Finalmente, a cultura uterina foi realizada nos momentos 0h e 96h.

Nos três ciclos estrais (G1, G2 e G3), as induções da ovulação foram seguidas por lavagem uterina com 1 litro de solução ringer-lactato e aplicação de 20 UI de ocitocina por via I.M.

Em G1 e G3, a inseminação ocorreu 24hrs pós-indução de ovulação com a deposição de sêmen fresco diluído, na dose de 1 bilhão de espermatozoides. A colheita de embrião foi realizada pelo sistema fechado, 8 dias após a ovulação. Os embriões, quando presentes, foram classificados quanto ao tamanho, grau de qualidade e estágio de desenvolvimento.

Em G2, a I.A foi substituída pelo tratamento com ozônio. A insuflação uterina com mistura gasosa O2-O3 foi realizada após a lavagem uterina com ringer-lactato. A ozonioterapia intra-uterina foi realizada com auxílio de uma pipeta de inseminação de equinos e cateter conectados a gerador de ozônio modelo O&L 1.5 RM portátil (Ozone & Life, São José dos Campos, São Paulo). Foi realizada a infusão de mistura gasosa contendo 40mcg O3 mL⁻¹ por 10 minutos conforme descrito anteriormente para a espécie (ÁVILA et al., 2022).

2.3. Parâmetros avaliados Após a higienização da região perineal, a colheita de amostras para cultura uterina foi realizada, utilizando uma guia metálica estéril, com swab estéril e descartável acoplado ao sistema para colheita da amostra. O procedimento consistiu em proteger a extremidade da guia entre o polegar e a palma da mão enluvada, introduzindo-o cuidadosamente na cavidade vaginal, passando pela cérvix até atingir o corpo do útero, expondo a haste, que entrou em contato com a mucosa uterina. Movimentos circulares foram realizados com a haste, mantendo-a em contato com a mucosa uterina por um período de 40 segundos (Amorim et al., 2022). Posteriormente, a haste foi recolocada dentro da guia, permitindo sua remoção do trato reprodutivo sem entrar em contato com os ambientes cervical, vaginal e vulvar (COCCHIA et al., 2012). A seguir, a haste foi desconectada do coletor e colocada em tubo contendo meio Stuart, apropriado para transporte. As amostras foram refrigeradas a 5°C até a realização das análises microbiológicas. As hastes foram então cultivadas em ágar sangue e incubadas a 36,7°C por 48 horas, sendo observadas após 24 e 48 horas para verificar o crescimento bacteriano. A classificação do crescimento bacteriano foi realizada conforme a presença de ausência de crescimento, flora mista (com dois ou mais organismos) ou isolado único (apenas um isolado bacteriano). Quando o crescimento bacteriano foi detectado, os organismos foram identificados como Gram-positivos ou Gram-negativos utilizando a técnica de coloração de Gram (SCHÖNIGER, et al., 2014).

Para a avaliação citológica uterina utilizou-se a mesma guia metálica, com uma escova uterina (*cytobrush*) estéril e descartável acoplada (WALTER et al., 2012 e BOHN et al., 2014). O procedimento consistiu em proteger a extremidade da guia metálica entre o polegar e a palma da mão enluvada, introduzindo-o cuidadosamente na vagina, passando pela cérvix até atingir o corpo do útero, expondo a escova, que entrou em contato com a mucosa uterina. Movimentos circulares foram realizados com a escova, mantendo-a em contato com a mucosa uterina por um período de 40 segundos (AMORIM et al., 2022). Posteriormente, a escova foi recolocada dentro da guia, permitindo sua remoção do trato reprodutivo sem entrar em contato com os ambientes cervical, vaginal e vulvar (COCCHIA et al., 2012). A seguir, a escova foi desconectada do guia metálica e pressionada em movimentos circulares em uma lâmina de microscopia previamente identificada. A lâmina foi então corada utilizando um método Romanowsky-type stain (FERRIS et al., 2015). A contagem de células foi conduzida conforme a metodologia descrita por Cocchia et al (COCCHIA et al., 2012).

A técnica de biópsia endometrial consistiu na obtenção, no diestro, após a ovulação de uma pequena amostra do tecido endometrial para análise histológica, sendo reconhecida como um método confiável e seguro no diagnóstico e prognóstico da endometrite. A colheita do fragmento foi realizada com o uso de uma pinça apropriada (Yeoman), via cavidade vaginal, protegida entre a palma da mão e polegar, penetrando no lúmen uterino. Após a passagem da cérvix, a mão enluvada era direcionada para o reto, tracionava-se a bifurcação uterina para baixo e um fragmento da parede uterina era apreendido e exteriorizado através de tração caudal na pinça (SNIDER et al., 2011). A classificação das amostras obtidas na biópsia endometrial, foram classificadas quanto ao grau de inflamação de acordo com os parâmetros definidos por Snider et al., 2011.

2.4 Análise estatística

Como os dados não obedeciam a premissa da distribuição normal de probabilidade, não atendendo, portanto, a premissa básica de variância paramétrica, optou-se então pela análise não paramétrica, utilizando-se o teste H de Kruskal-Wallis para citologia uterina e Qui-quadrado para recuperação embrionária.

3. RESULTADOS

A média de neutrófilos na citologia uterina, por grupo, está representado na Tabela 1. Observou-se uma diminuição significativa ($P<0,05$) no infiltrado inflamatório ao longo dos ciclos estrais pós-tratamento intra-uterino com ozônio (G2 e G3).

Tabela 1. Citologia uterina (média $\pm$ desvio padrão; %) para neutrófilos polimorfonucleares em 3 ciclos estrais sucessivos em oito éguas subférteis: G1, G2 e G3 (Ciclos estrais Controle, Tratamento e Pós-tratamento, respectivamente). Em G2 foi realizado insuflação uterina com mistura gasosa O_2-O_3 ($40\text{mcg } O_3 \text{ mL}^{-1}/10 \text{ min}$).

	Ciclo estral		
	G1	G2	G3
Neutrófilos por ciclo estral	$1,70 \pm 2,64^a$	$0,22 \pm 0,96^b$	$0,61 \pm 0,88^b$

^{a, b, c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P<0,05$).

Independente do grupo e do tempo experimental, com exceção de um animal, todas as éguas apresentaram culturas positivas antes e depois do tratamento. O percentual de colônias detectadas por meio do exame de cultura bacteriana em cada égua participante do experimento, de acordo com o ciclo de avaliação em 0h e 72h é apresentado (Tabela 2).

Tabela 2. Ocorrência em (%) de colônias bacterianas, no ambiente uterino de éguas, detectadas por meio da análise de culturas provenientes da colheita de amostras; realizada através da utilização de guia metálica, equipado com swab estéril e descartável, em 3 ciclos estrais sucessivos, G1 (ciclo controle), G2 (ciclo tratamento com mistura O_2-O_3) e G3 (ciclo pós-tratamento), no dia da indução da ovulação (0h) e 72h após a indução.

	G1		G2		G3	
	0h	72h	0h	72h	0h	72h
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5	12,5	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i>	12,5	12,5	12,5	0	0	0
<i>Bacillus sp</i>	0	0	75	75	87,5	75
<i>Enterobacter sp.</i>	37,5	37,5	50	87,5	25	37,5
<i>Escherichia coli</i>	37,5	62,5	50	62,5	37,5	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	0	0	0	0	0

<i>Flavobacterium sp.</i> ,	0	0	12,5	0	0	0
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0	0	12,5	12,5	0	0

Observa-se que a colônia de maior prevalência no G1 foi de *E. coli*, após 72 horas da indução de ovulação, com uma prevalência de 62,5%. Entretanto, colônias como *B. sp.*, *F. sp.* e *C.violaceum* não foram detectadas no G1.

Ao se analisar o resultado do exame de cultura bacteriana no G2, a colônia de maior prevalência foi de *Enterobacter sp.*, representando 87,5% das ocorrências após 72 horas da indução de ovulação, *Bacillus sp.* e *C. violaceum* apresentaram a mesma frequência tanto à 0 hora quanto às 72 horas após a indução de ovulação, com 75% e 12,5% respectivamente.

No G3, as colônias de *B.sp.* apresentaram uma frequência de ocorrência de 87,5% já no exame de cultura realizado à 0 hora após a indução de ovulação, e está se manteve em 75% às 72 horas após a indução. Colônias como *S. aureus*, *S. sp.*, *P. aeruginosa*, *F sp.* e *C. violaceum*, não foram detectados em nenhum dos intervalos de avaliação.

Conforme apresentado pelo Quadro 1, os resultados de biópsias uterinas obtidos neste estudo demonstraram que entre a primeira e segunda colheita de material um animal apresentou mudança do grau de classificação, sendo está a égua de número 6 o qual passou de grau II para o grau I. Os demais animais continuaram a se enquadrar na classificação de grau I, não sofrendo mudanças entre a primeira e a segunda colheita, sendo importante ressaltar que o tratamento instituído não induziu a degeneração uterina a curto prazo.

Tabela 3. Categorização dos graus de inflamação uterina, obtidos através da análise de um fragmento retirado por biópsia uterina, antes (1ª colheita, G1) e após o tratamento (segunda colheita, G3) com insuflação uterina de mistura de gás O₂-O₃.

Colheita	1ª	2ª
Égua 1	Grau I	Grau I
Égua 2	Grau I	Grau I
Égua 3	Grau I	Grau I
Égua 4	Grau I	Grau I
Égua 5	Grau I	Grau I
Égua 6	Grau II	Grau I
Égua 7	Grau I	Grau I
Égua 8	Grau I	Grau I

Não houve diferença no número de embriões recuperados independentemente do tratamento aplicado entre G1 ($0,4 \pm 0,5$) e G3 ($0,5 \pm 0,5$), $P>0,05$.

4. DISCUSSÃO

Houve uma diminuição da resposta inflamatória uterina em éguas expostas a infusão da mistura O_2-O_3 que passaram a apresentar um número de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) por campo inferior ao grupo controle, sendo assim eficaz na modulação do processo inflamatório, além de corroborar com os resultados já demonstrados por Ávila et al., (2022).

Ferreira et al., (2021) demonstraram que o preenchimento do lúmen uterino com O_2-O_3 leva a multiplicação celular sem manifestar efeitos prejudiciais ao endométrio. O que foi observado no presente experimento no G2, indicando a possibilidade de utilização do ciclo tratamento para cobertura dessa égua, não sendo necessário aguardar o próximo ciclo, como se acreditava e é a rotina dos veterinários de campo, de não utilizar o ciclo tratamento.

Os resultados obtidos através da cultura uterina deste trabalho (Tabela 2) quando comparados aos resultados encontrados por Ávila et al. (2022) sugerem que quando associada aos tratamentos convencionais a infusão de gás ozônio direto no ambiente uterino das éguas subfértéis foi eficiente no controle da proliferação bacteriana do que a administração tópica de óleo ozonizado no lúmen do útero das éguas.

Os resultados apresentados por este trabalho demonstram que o não aparecimento de colônias como *S. aureus*, *S. sp.*, *P. aeruginosa*, *F. sp.* e *C. violaceum*, que não foram detectados em nenhum dos intervalos das avaliações, assim como mudança do grau de classificação de um animal o qual passou de grau II para o grau I, podem estar relacionados a eficiência da aplicação direta do gás ozônio que assegura que o O_3 seja introduzido em sua forma mais ativa e potente, oferecendo um efeito germicida mais rápido e eficiente em relação a produtos ozonizados que podem sofrer redução na concentração de ozônio devido à degradação ao longo do tempo, também não foram detectadas alterações microscópicas sugestivas de degeneração endometrial. Essa abordagem direta permite um controle mais rigoroso da dosagem de ozônio aplicada, essencial para atender às necessidades específicas de cada finalidade, melhorando assim os resultados terapêuticos (DE SIRE et al., 2022; WEI et al., 2018).

Os efeitos antimicrobianos da infusão direta de gás O_2-O_3 no ambiente uterino de éguas demonstrados no presente experimento corroboram o também encontrado por Ávila et al. (2022). Donato e colaboradores (2024) descreveram o efeito antimicrobiano *in vitro* de diferentes preparações de ozônio sobre isolados clínicos responsáveis por causar endometrite em éguas, onde a administração de ozônio em sua forma gasosa mostrou-se eficaz quanto a sua atuação como agente bactericida, uma vez que em todas as concentrações e tempos de

exposição alcançaram uma redução no número de UFC/mL de mais de 99,9% em todas as bactérias testadas, sejam elas Gram⁺ ou Gram⁻. Ferreira et al. (2021) sugerem que além do potencial antimicrobiano sobre as formas livres de bactérias e fungos, o ozônio também apresenta forte potencial de inibição de biofilmes.

Com relação as biópsias uterinas, apenas uma égua não apresentou classificação de grau I no grupo controle, e sim grau II e após o tratamento com a mistura O₂-O₃ passou a ser classificada como grau I. O que sugere que novos experimentos com éguas selecionadas em grau II e grau III possam ser tratadas para que novas biópsias possam ser realizadas para aferir o potencial da ozonioterapia também na qualidade do endométrio, já que o ozônio apresenta atividade angiogênica como já comprovado por Ferreira et al. (2021). Não foram verificados nenhum efeito maléfico comprovados por histologia no endométrio dos animais que foram submetidos ao tratamento com a insuflação de gás ozônio diretamente no ambiente uterino, já que nenhuma égua apresentou alteração negativa na classificação dos graus, corroborando os estudos de Botelho et al (2024) onde nenhuma das éguas tratadas apresentou reações adversas à administração de ozônio durante o período experimental e a endometrite juntamente com seus efeitos de interação não afetaram a altura e a espessura do epitélio endometrial.

Não foi observado nenhum sinal de desconforto após a infusão da mistura de gás O₂-O₃ na concentração e tempo utilizado, nem no dia nem em dias posteriores, além de o uso da infusão direta de gás assegurar o controle da dose administrada e a ausência de efeitos prolongados do mesmo no organismo. Ao contrário do observado por Avila et al. (2022), com a infusão uterina de óleo ozonizado, que observaram sinais visíveis de desconforto expressados através de comportamentos como manter a cauda elevada e arqueamento de coluna.

O tratamento com ozônio, na dose e tempo administrado neste trabalho, não exerceu nenhuma influência positiva na recuperação embrionária das éguas, fato este que pode estar associado a outros fatores diferentes a condição uterina das mesmas, sendo conhecido o fato que a taxa de recuperação embrionária em éguas consideradas clinicamente normais é elevada quando comparada à de animais subférteis. Esse fato pode estar relacionado a falhas reprodutivas observadas em éguas com idade avançada como distúrbios da ovulação e maturação oocitária, bem como distúrbios hormonais (deficiência de FSH, LH, E2, T4 etc.).

5. CONCLUSÃO

A utilização da mistura gás O₂-O₃ associada ao tratamento convencional utilizado neste trabalho foi eficaz na modulação do processo inflamatório uterino além de reduzir o crescimento bacteriano, demonstrando ser uma terapia adjuvante bastante eficaz em sua

associação. Não houve influência da ozonioterapia na produção e qualidade embrionária, no entanto o tratamento instituído não afetou negativamente a mesma.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ávila ACA, Diniz, NC, Serpa RT, Chaves MMBC, Viu MAO, Oliveira, RA. Effectiveness of ozone therapy in the treatment of endometritis in mares. J Equine Vet Sci 2022: 112, 103900. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103900>

Amorim G, Segabinazzi LGTM, Oliveira OM, Perecmanis S, Arruda R, Canisso IF. Uterine inflammatory response after prostaglandin E1 (misoprostol) infusion prebreeding or immediately after embryo flushing in commercial mares. J Vet Sci 2022, v.177, 104060. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104060>

Bohn AA.; Ferris RA.; Mccue PM. Comparison of equine endometrial cytology samples collected with uterine swab, uterine brush, and low-volume lavage from healthy mares. Vet Clin Pathol 2014: 43, 594-600. DOI: 10.1111/vcp.12194

Botelho JHV, Pessoa GO, Caixeta ES, Sales G, De Oliveira KR, Neto JDPN, Ferreira RD, Palhão MP. Does the Uterine Ozone Therapy Alter the Transcript Profile of Anti-and Proinflammatory Genes in Mares With Endometritis?. Anim. Reprod. 2024: 59 e14718. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.14718>

Brinsko SP, Rigby SL, Varner DD, Blanchard TL. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. Proc Am Assoc Equine Pract 2003: 49,363-365.

Brinsko SP, Varner DD, Shumacher J, Love CC, Hinkichs K, Hartman D. Manual of Equine Reproduction. 3.ed Elsevier, 2011.

Calderon I, Cohen M, Sagi-dain L, Artzi O, Bejar J, Sagi S. The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium – A preliminary study. J Obstet Gynaecol 2016: 36, 635-640. DOI: 10.3109/01443615.2015.1133579

Canisso IF.; Segabinazzi LGTM; Fedorka CE. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares-a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. Int. J. Mol. Sci 2020: 21,1432. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21041432>

Causey RC., Miletello T, O'donnell L, Lyle SK., Paccamonti DL, Anderson KJ, Elits BE, Morse B, Leblanc MM. Pathologic Effects of Clinical Uterine Inflammation on the Equine Endometrial Mucosa. American Association of Equine Parctitioners 2018: 54, 276-277.

Cocchia N, Paciello O, Auletta L, Uccello V, Silvestro L, Mallardo K, Paraggio G, Pasolini MP. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush

954 techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically
 955 infertile mares. *Theriogenology* 2012: 77, 89-98. DOI:
 956 [10.1016/j.theriogenology.2011.07.020](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.020)

957 **De Sire A, Marotta N, Ferrillo M, Agostini F, Sconza C, Lippi L, Respizzi S, Guidice**
 958 **A, Invernizzi M, Ammendolia A.** Oxygen-ozone therapy for reducing pro-inflammatory
 959 cytokines serum levels in musculoskeletal and temporomandibular disorders: a
 960 comprehensive review. *Int. J. Mol. Sci* 2022: 23, 2528. DOI:
 961 <https://doi.org/10.3390/ijms23052528>

962 **Donato GG, Nebbia P, Stella MC, Scalas D, Necchi D, Bertero A, Romano G, Bergamini**
 963 **L, Poletto ML, Peano A, Robino P, Nervo T.** In vitro effects of different ozone preparations
 964 on microorganisms responsible for endometritis in the mare. *Theriogenology* 2024: 219, 132-
 965 137 <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.02.011>

966 **Ferris RA, Bohn A, McCue PM.** Equine endometrial cytology: Collection techniques and
 967 interpretation. *Equine Vet Educ* 2015: 27, 316-322. DOI: 10.1111/eve.12280

968 **Ferreira JC, Amaral RS, De Souza CB.** Ozonioterapia no tratamento auxiliar de éguas
 969 inférteis: Potencial angiogênico e antimicrobiano. *Rev Bras Reprod Anim*, 2021: 45, 482-
 970 488. DOI:10.21451/1809-3000.rbra2021.064

971 **Ferreira JC, Amaral RS, Cardoso LM, Marchió SP, Rodrigues MA, Alves CEF, Meira**
 972 **C.** Endometrial angiogenesis induced by uterine insufflation with an oxygen-ozone gas mixture
 973 in mares. *Reprod Domest Anim* 2021:56, 1176-1183. DOI: [10.1111/rda.13958](https://doi.org/10.1111/rda.13958)

974 **Ganaie BA, Japheth KP, Ali M, Lone SA, Mir SH, Malik TA.** An insight into the
 975 pathophysiology, preventive and treatment strategies of retained fetal membranes in
 976 bovines—a review. *J. Anim. Health Prod* 2018: 6, 62-72.
 977 DOI:10.17582/journal.jahp/2018/6.2.62.72

978 **Katila T.** Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reprod Biol* 2016: 16,
 979 189-196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2016.06.002>

980 **Leblanc MM, Magsig J, Stromberg A.J.** Use of a low-volume uterine flush for diagnosing
 981 endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 2007: 68, 403-412. DOI:
 982 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.038>

983 **Leblanc MM, Causey RC.** Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to
 984 fertility. *Anim. Reprod* 2009:44, 10-22. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x)

985 **Leblanc M.M.** Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and postmating-
 986 induced endometritis in the mare. *RDA* 2010:45, 21-27. DOI: [10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x)
 987 [0531.2010.01634.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x)

988 **Lima RAS, Cintra AG.** Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. .
 989 Brasília: MAPA. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view)
 990 [setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view)
 991 [do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view).
 992 **MAPA.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão do Estudo do
 993 Complexo do Agronegócio do Cavalo. 2016. Disponível em:
 994 [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo)
 995 [tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo)
 996 [do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo)
 997 **Morris LH; Mccue PM, Aurich C.** Equine endometritis: A review of challenges and new
 998 approaches. Reproduction, 2020: 160, 95-110. DOI: [10.1530/REP-19-0478](https://doi.org/10.1530/REP-19-0478)
 999 **Sá MAF, Lima TFG, Moraes RCL, Dutra GA, Jesus VLT, Jacob JCF.** Acute
 1000 endometritis induced by Escherichia coli in mares evaluated through color doppler
 1001 ultrasonography. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2020, v. 72, p.
 1002 1586-1598. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11904>
 1003 **Samardzija M, Turk R, Sobiech P, Valpotic H, Harapin I, Gracner D, Duricic D.**
 1004 Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: a review. Vet.
 1005 Arh 2017: 87, 363-375. DOI:10.24099/VET.ARHIV.160119A
 1006 **Scassellati C, Ciani M, Galoforo AC, Zanardini R, Bonvicini C, Geroldi C.** Molecular
 1007 mechanisms in cognitive frailty: potential therapeutic targets for oxygen-ozone treatment.
 1008 Mech. Ageing Dev 2020: 186, 111210. DOI: 10.1016/j.mad.2020.111210
 1009 **Schöniger S, Sieme H, Mönnig F, Richter, Martinsson G, Verspohl J, Schoon HA.**
 1010 Endometrial health and disease in the mare: comparison of histopathological findings and
 1011 microbiological results of two different culture methods (uterine swab and endometrial
 1012 tissue). Pferdeheilkunde 2014;30, 26-36. DOI:10.21836/pem20140104
 1013 **Scoggin CF.** Endometritis: nontraditional therapies. Vet. Clin. North Am. Equine Pract
 1014 2016: 32, 499-511. DOI: 10.1016/j.cveq.2016.08.002
 1015 **Snider TA, Sepoy C, Holyoak GR.** Equine endometrial biopsy reviewed: observation,
 1016 interpretation, and application of histopathologic data. Theriogenology 2011: 75, 1567-
 1017 1581. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.013
 1018 **Troedsson MHT.** Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare.
 1019 Theriogenology 1999: 52, 461-471. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00143-0
 1020 **Troedsson MHT, Liu IKM, Crabo BG.** Sperm transport and survival in
 1021 the mare. Theriogenology 1998: 50, 807-818. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00040-5)
 1022 [691X\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00040-5)

1023 **Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG.** Interaction between equine
1024 semen and the endometrium: The inflammatory response to semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2001:
1025 v. 68, 273–278. DOI: [10.1016/s0378-4320\(01\)00164-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00164-6)
1026 **Walter J, Neuberg KP, Failing K, Wehrend A.** Cytological diagnosis of endometritis in
1027 the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Anim.*
1028 *Reprod. Sci* 2012: 132, 178-186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.012>
1029 **Wei A, Feng H, Jia XM, Liao YY, Li BR.** Ozone therapy ameliorates inflammation and
1030 endometrial injury in rats with pelvic inflammatory disease. *Biomed. Pharmacother* 2018:
1031 107, 1418-1425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.137>