



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Luana Factor

RESPOSTA ENDOMETRIAL APÓS OZÔNIO INTRAUTERINO EM  
ÉGUAS

ENDOMETRIAL RESPONSE AFTER INTRAUTERINE OZONE IN  
MARES

Data da defesa: Novembro/2017

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cássia Maria Barroso Orlandi

DESCALVADO - SP

2017



CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Luana Factor

RESPOSTA ENDOMETRIAL APÓS OZÔNIO INTRAUTERINO EM  
ÉGUAS

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Banca Examinadora, como  
parte das exigências da matriz curricular do  
curso de graduação em Medicina Veterinária  
da UNIVERSIDADE BRASIL – Campus de  
Descalvado – SP.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cássia Maria Barroso Orlandi

Descalvado

2017

F127r Factor, Luana  
Resposta endometrial após ozônio intrauterino em éguas  
/ Luana Factor. -- Descalvado: [s.n.] : 2017.  
52f. : il. ; 29,5cm.

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Brasil – Campus Descalvado – SP.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cássia Maria Barroso Orlandi

1. Inflamação. 2. Ozonioterapia. 3. Equino. 4. Útero.  
5. Fertilidade. I. Título.

CDD 636.1

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente a minha família, a qual é extremamente importante para mim e possibilitou a realização deste sonho, a minha professora orientadora e a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino e meu guia.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Sr. Sebastião Factor e Sr<sup>a</sup>. Darlene Aparecida Franzin Factor o qual possibilitaram a realização deste sonho sempre com muito amor, carinho e apoio e não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida. Aos meus irmãos Diego Roberto Factor e Lucas Eduardo Factor pela amizade, companheirismo, vocês são extremamente especiais em minha vida.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Cassia Maria Barroso Orlandi, que acreditou na realização deste trabalho, pelo apoio, convívio, compreensão e amizade. Os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos do currículo, obtive aprendizados importantes para a vida

A todos os professores que durante muito tempo me ensinaram e me mostraram o quanto estudar é bom.

Ao mundo por mudar as coisas, por nunca as fazer serem da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar, o que descobrir e o que fazer, pois através disto consegui concluir a minha monografia.

E a todos, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*Fé, audácia e trabalho... Combinação perfeita do sucesso!*

*Leonardo Dourado Sande*

# RESPOSTA ENDOMETRIAL APÓS OZÔNIO INTRAUTERINO EM ÉGUAS

## RESUMO

A endometrite pode ser causada pela entrada de patógenos no trato reprodutivo. Como método de tratamento em processos inflamatórios e ou infecciosos em diversos sistemas nos animais a ozonioterapia vêm sendo amplamente utilizada, embora sejam escassas as informações na literatura sobre a resposta endometrial equina à exposição ao ozônio (O<sub>3</sub>). O presente estudo teve como objetivo determinar a resposta endometrial quanto a presença de polimorfonucleares neutrófilos à exposição ao O<sub>3</sub>, por meio de citologia e avaliação ultrassonográfica uterina. Foram utilizadas para o experimento oito éguas mestiças receptoras de embriões entre cinco e 15 anos de idade, pesando até 450 kg, vazias desde a estação reprodutiva anterior, estando em fases aleatórias do ciclo estral. Para o treinamento inicial e execução dos procedimentos de citologia foram utilizadas duas éguas do Hospital Escola, as quais não fizeram parte do experimento. As éguas do experimento foram submetidas ao O<sub>3</sub> intrauterino (concentração de 52 µg/ml, 10 min, fluxo 0,12 L/min) durante três dias consecutivos a cada 24 horas. Percentagens média de neutrófilos foram determinados por meio da citologia uterina e os parâmetros uterinos (TC = tônus de cérvix; PA = presença de ar; PF= presença de fluido; TU = tônus uterino; EU = edema uterino e CC = ciclicidade) por meio de ultrassonografia e exame ginecológico trans-retal. As avaliações foram obtidas nos momentos pré, durante e pós-tratamento. As variáveis foram submetidas à análise de agrupamento, utilizando-se a distância euclidiana, método *complete linkage* e gráfico bidimensional das variáveis observadas. A porcentagem de neutrófilos sofreu mudanças no lúmen uterino como verificado por meio de citologia durante a exposição ao O<sub>3</sub> em todas as éguas. Tais éguas inicialmente foram classificadas dentro da categoria normal a leve quanto a presença de neutrófilos no útero. No entanto, a magnitude do aumento de neutrófilos assim como permanência ou diminuição ao final do tratamento resultou em mudanças na classificação clínica da endometrite. Tais mudanças foram influenciadas tanto pela fase do ciclo estral, como pela condição uterina inicial. As análises possibilitaram o agrupamento das éguas de acordo com as respostas caracterizadas por parâmetros uterinos comuns observados no decorrer do tratamento. Dentre tais parâmetros, a ciclicidade, presença de ar no útero e tônus uterino exerceram maior influência sob

as respostas aos tratamentos nos momentos avaliados. Desta forma, quanto a ciclicidade, observou-se que éguas no estro durante a exposição ao O<sub>3</sub> responderam com baixo infiltrado de neutrófilos. No entanto, éguas que iniciaram o diestro durante o tratamento, com detecção de ovulação, apresentaram aumento de infiltrado de neutrófilos no útero, o qual teve sua magnitude relacionada à classificação inicial do quadro (normal a leve). Conclusão: Ao contrário do que ocorre fisiologicamente no útero de éguas cíclicas não expostas a quaisquer tratamento, houve maior magnitude quanto à presença de neutrófilos ao O<sub>3</sub> no útero em diestro quando comparado ao estro. Portanto, o aumento de neutrófilos com exposição ao O<sub>3</sub>, parece ser hormonalmente modulado de acordo com a fase na qual é realizado o tratamento.

**Palavras-chave:** inflamação, ozonioterapia, equino, útero, fertilidade.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiv
LISTA DE QUADROS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xvi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. JUSTIFICATIVA .....	3
3. OBJETIVO GERAL .....	4
3.1. Objetivos Específicos.....	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
4.1. Endometrite .....	5
4.2. Diagnóstico .....	6
4.2.1. Citologia uterina .....	6
4.2.2. Ultrassonografia .....	10
4.3. O efeito da fase do ciclo estral no diagnóstico da endometrite na égua .....	11
4.4. Ozonioterapia .....	13
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
5.1. Tipo de pesquisa .....	15
5.2. Aspectos éticos.....	15
5.3. Local .....	15
5.4. Animais .....	16
5.5. Instrumentação .....	17
5.6. Procedimentos.....	19
5.6.1. Exames de Triagem .....	19
5.6.2. Preparação da região perineal .....	20
5.6.3. Avaliação externa da região perineal .....	20
5.6.4. Exame trans-retal .....	21

5.6.5. Exame ultrassonográfico .....	22
5.6.6. Protocolo experimental.....	23
5.6.7. Realização da Ozonioterapia e frequência dos tratamentos .....	23
5.6.8. Citologia uterina pela técnica de escova ginecológica .....	24
5.6.9. Confeção das lâminas .....	25
5.6.10. Processamento laboratorial das amostras de citologia .....	25
5.6.11. Avaliações microscópicas das lâminas de citologia .....	26
5.6.12. Classificação das lâminas de citologia uterina .....	27
5.7. Análise de dados .....	28
5.7.1. Análise Estatística .....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6.1. Escore da condição corporal das éguas .....	30
6.2. Estágio do ciclo estral .....	31
6.3. Classificação da endometrite .....	31
6.4. Tônus uterino .....	33
6.5. Tônus de cérvix .....	34
6.6. Presença de fluido .....	35
6.7. Presença de ar .....	37
6.8. Edema de útero .....	37
6.9. Dendogramas e projeção bidimensional das análises de agrupamentos .....	39
7. CONCLUSÕES .....	44
ANEXOS .....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia da Fazenda Santo Antônio de Palmares, Centro de Reprodução Equina em Pratânia, SP. ....	16
Figura 2: Éguas utilizadas no experimento alojadas na Fazenda Santo Antônio de Palmares, Centro de Reprodução Equina em Pratânia, SP. ....	16
Figura 3: Ultrassom Shenzhen Mindray, Biomedical electronics CO- LTD. ....	17
Figura 4: Gerador de Ozônio. ....	17
Figura 5: Gás cilindro de Ozônio. ....	18
Figura 6: Sonda modelo Bivona® utilizada no experimento. ....	18
Figura 7: Pinça de inox com haste dupla para exame de citologia uterino na égua. (Botupharma®; Ltda; Botucatu, SP, BRASIL). ....	18
Figura 8: Escova ginecológica. ....	19
Figura 9: Assepsia da região perineal. ....	20
Figura 10: Procedimento de avaliação da conformação vulvar na égua com dedo indicador e observação da extensão de abertura na comissura dorsal e coaptação dos lábios vulvares. ....	20
Figura 11: Procedimento de avaliação da conformação vulvar na égua com dedo indicador e observação da angulação dos lábios vulvares. ....	21
Figura 12: Região perineal após higienização para início da abordagem trans-vaginal do trato reprodutivo. ....	21
Figura 13: Introdução da haste na vagina com sua ponta protegida pelo dedo indicador. ....	24
Figura 14: Recipientes com soluções (Panótico Rápido) para coloração dos esfregaços obtidos pela citologia uterina. ....	25
Figura 15: Lâminas coradas pelo Panótico Rápido. ....	26

- Figura 16: Microscopia óptica com visualização de aglomerado de células endometriais na objetiva de 100x.....26
- Figura 17: Presença de neutrófilos (seta e círculo vermelhos) no epitélio de revestimento do lúmen uterino na égua. A seta preta e a amarela apontam outras denominações de células inflamatórias.....27
- Figura 18: Porcentagem de neutrófilos observados na citologia uterina em éguas submetidas ao tratamento com ozônio nos momentos pré, durante (pós T1, T2) e pós tratamento (Pós T3). .....33
- Figura 19: Dendograma resultante da análise de agrupamento das éguas em função das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em oito éguas antes do tratamento intrauterino com Ozônio, pelo método “complete linkage” e considerando as distâncias Euclidianas.....39
- Figura 20: Dendograma resultante da análise de agrupamento das éguas em função das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em 8 éguas durante o tratamento intrauterino com Ozônio, pelo método “complete linkage” e considerando as distâncias Euclidianas.....39
- Figura 21: Dendograma resultante da análise de agrupamento das éguas em função das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em 8 éguas após o tratamento intrauterino com Ozônio, pelo método “complete linkage” e considerando as distâncias Euclidianas.....40
- Figura 22: Dendograma resultante da análise de agrupamento das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em éguas antes do tratamento com Ozônio intrauterino, pelo método “complete linkage” e considerando as distâncias Euclidianas. TC = Tônus de cérvix; SC = Escore corporal; PA = Presença de ar; PF = presença de fluido, TU = Tônus uterino; NT = Neutrófilos; EU = Edema uterino; CC = Ciclicidade. ....41
- Figura 23: Dendograma resultante da análise de agrupamento das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em éguas durante o tratamento com Ozônio intrauterino (após 2 tratamentos), pelo método “complete linkage” e considerando as distâncias Euclidianas. TC = Tônus de

cérvix; SC = Escore corporal; PA = Presença de ar; PF = presença de fluido; TU = Tônus uterino; NT = Neutrófilos; EU = Edema uterino; CC = Ciclicidade.....41

Figura 24: Dendograma resultante da análise de agrupamento das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em éguas após o terceiro tratamento com Ozônio intrauterino, pelo método “complete linkage” e considerando as distâncias Euclidianas. TC = Tônus de cérvix; SC = Escore corporal; PA = Presença de ar; PF = presença de fluido, TU = Tônus uterino; NT = Neutrófilos; EU = Edema uterino; CC = Ciclicidade. ....42

Figura 25: Projeção bidimensional dos resultados obtidos nas análises das variáveis de parâmetros uterinos em função das éguas nos respectivos momentos. Número seguido de letras representam a identificação das éguas e o momento (a = pré tratamento; d = durante o tratamento; p = pós tratamento. Duas letras maiúsculas representam os parâmetros avaliados (TC = Tônus de cérvix; SC = Escore corporal; PA = Presença de ar; TU = Tônus uterino; NT = Neutrófilos; EU = Edema uterino; CC = Ciclicidade).....43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação e contagem de polimorfonucleares neutrófilos nas preparações citoscópicas para classificação da endometrite em éguas. ....	7
Tabela 2: Classificação da endometrite de acordo com a porcentagem de neutrófilos. ....	27
Tabela 3: Identificação das éguas, raça e escore corporal. ....	30
Tabela 4: Ciclicidade de cada em égua no pré tratamento, pós primeiro e segundo tratamento, pós terceiro tratamento e após 4 dias do último tratamento. ....	31
Tabela 5: Número de éguas com classificação da endometrite de acordo com a condição uterina baseada no número de neutrófilos, nos momentos pré, durante e pós tratamento com Ozonioterapia. ....	32
Tabela 6: Tônus uterino das éguas no decorrer dos tratamentos com Ozonioterapia. ....	34
Tabela 7: Grau de relaxamento da cérvix no decorrer dos tratamentos com Ozonioterapia. ....	35
Tabela 8: Classificação de acordo com a presença ou ausência de fluido no lúmen uterino das éguas no decorrer do tratamento com Ozônio. ....	36
Tabela 9: Classificação de acordo com a presença ou ausência de ar no lúmen uterino das éguas no decorrer do tratamento com Ozônio. ....	37
Tabela 10: Classificação de acordo com a visualização do edema de útero das éguas avaliado por meio de ultrassonografia no decorrer do tratamento com Ozônio. ....	38

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Cronologia dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental.  
.....24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µg/ml</b>	Micrograma por mililitro
<b>a</b>	Pré tratamento
<b>CC</b>	Ciclicidade
<b>d</b>	Durante tratamento
<b>EU</b>	Edema uterino
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>L/min</b>	Litros por minutos
<b>min</b>	Minutos
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozônio
<b>p</b>	Pós tratamento
<b>PA</b>	Presença de ar
<b>PF</b>	Presença de fluido
<b>TC</b>	Tônus de cérvix
<b>TE</b>	Transferência de embriões
<b>TU</b>	Tônus uterino



## 1. INTRODUÇÃO

A endometrite pode ser causada pela entrada de patógenos no trato reprodutivo, sendo normalmente resultado da resposta inflamatória em éguas susceptíveis, as quais são expostas às condições predisponentes como: monta natural, inseminação artificial, com sêmen fresco ou congelado; assim como entrada de ar, fezes e ou urina devido às anormalidades de vulva e vestibulo. Esta afecção tem grande importância econômica na medicina veterinária, podendo resultar em morte embrionária, aborto ou infertilidade.

A manutenção e o manejo de um grande grupo de éguas exige muito trabalho e invariavelmente demandam um alto custo investido em área para pastagem, infraestrutura, alimentação com volumoso e concentrado, cuidados sanitários e veterinários, medicamentos e mão-de-obra qualificada. Todos esses custos reunidos podem se transformar em um volume final muito alto de capital investido, podendo mesmo inviabilizar determinado programa de transferência de embriões (TE), tornando o custo de uma égua receptora vazia muito caro e inviável.

Desta forma, terapias que possam superar as afecções uterinas, tendo como base diagnósticos rápidos e viáveis economicamente, podem contribuir para o manejo reprodutivo da égua.

O diagnóstico da endometrite por meio de citologia uterina pela escova ginecológica tem como objetivo avaliar a porcentagem de neutrófilos presente na visualização cistoscópica. A técnica é de execução rápida, de baixo custo e permite o diagnóstico efetivo dentro de um curto período de tempo. No entanto, o procedimento exige competência profissional do Médico Veterinário para realização da coleta de material e confiabilidade no laboratório na realização da leitura das lâminas e interpretação dos resultados para conduta clínica adequada.

Várias substâncias tem sido usados para tratamento da endometrite, embora problemas com resistência ocorrem por erro ou ausência de diagnóstico correto, resultando em endometrite fúngica, a qual dificilmente é diagnosticada rapidamente e tratada com sucesso.

O O<sub>3</sub> é um gás altamente instável, incolor e com alto poder microbicida no tratamento de enfermidades e esterilização de equipamentos na medicina veterinária. Este composto gasoso vem sendo utilizado de forma prática, por ter um custo relativamente baixo no tratamento.

A ozonioterapia tem sido amplamente utilizada como método de tratamento em processos inflamatórios e ou infecciosos em animais, embora sejam escassas as informações na literatura a respeito dos efeitos do Ozônio ( $O_3$ ) em contato com o endométrio de fêmeas equinas.

## 2. JUSTIFICATIVA

Terapias alternativas para o tratamento da endometrite são desenvolvidas, muitas vezes empiricamente, com escassez de testes prévios, os quais possam comprovar a efetividade, efeitos adversos, assim como concentrações e vias de administração adequada. Portanto, o presente estudo avaliou a resposta do endométrio, quanto aos parâmetros uterinos e a presença de neutrófilos após a exposição ao O<sub>3</sub>.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Verificar a resposta uterina ao O<sub>3</sub> por meio da citologia e ultrassonografia durante fases aleatórias do ciclo estral na égua.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

Comprovar a viabilidade do uso do O<sub>3</sub> por meio exclusivo de infusão gasosa no lúmen uterino de éguas sub-férteis (diagnóstico de prenhez negativo pós inovulação na estação reprodutiva anterior) em fases aleatórias do ciclo estral.

Determinar o grau de resposta inflamatória uterina, representada por número de neutrófilos em relação ao número de células epiteliais no decorrer do tratamento com O<sub>3</sub> por meio de citologia uterina.

Avaliar por meio de ultrassonografia, a progressão do grau de edema, presença de fluido e ar no lúmen uterino durante as respectivas fases do ciclo estral em éguas submetidas ao O<sub>3</sub>.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Endometrite

A endometrite na égua é definida como uma inflamação do endométrio podendo ser aguda ou crônica, infecciosa ou não infecciosa. Esta afecção compromete a sanidade uterina, colocando em risco os índices de prenhez obtidos pós cobertura, pós inseminação e pós inovulação de embriões (LEBLANC et al., 2007).

A endometrite é uma das principais causas de subfertilidade e infertilidade, caracterizada por morte embrionária precoce ou perda gestacional no terço médio por falha na interação materno–fetal. Há um grande impacto econômico desta afecção para a produção/reprodução equina, uma vez que a égua ao deixar de gerar um potro anualmente, representa alto custo de manutenção (OLIVEIRA, 2006).

As causas de endometrite estão normalmente associadas às bactérias aeróbicas, podendo haver envolvimento de pneumovagina, urovagina, exposição ao sêmen ou pela infusão uterina com substâncias inadequadas (CAMOZZATO et al., 2009). De acordo com Brito e Barth (2003), a doença é subdividida em 4 categorias: Endometrite Infecciosa Crônica, Endometrite Persistente Pós Cobertura (EPPC), Endometrite Crônica Degenerativa (Endometriose) e Endometrite Causada por Bactérias Sexualmente Transmissíveis. Os autores informam que a endometrite infecciosa crônica é normalmente causada pelo microorganismo *Streptococcus equi zooepidemicus*, e quando encontrado no meio de cultura, é diagnosticada como positiva.

A EPPC ocorre geralmente após a cobertura, pois acontece um processo inflamatório passageiro no endométrio, com o intuito de remover do útero o excesso de espermatozóides, plasma seminal e contaminantes, com isso, se a égua for susceptível à afecção ou já apresentar a mesma, será incapaz de superar o processo inflamatório, afetando negativamente as taxas de prenhez e será diagnosticada como positiva (LEBLANC et al., 2007).

Segundo Kenney (1978), a endometrite crônica degenerativa (endometriose) é definida como uma fibrose periglandular e/ou estromal ativa ou inativa que inclui alterações glandulares com focos fibróticos, a qual é diagnosticada por meio de biópsia uterina e classificada de acordo com o grau de fibrose.

E por fim, a endometrite por bactérias sexualmente transmissíveis (ou endometrite contagiosa equina), na qual normalmente encontram-se os agentes etiológicos: *Taylorella equigenitalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (BRITO & BARTH, 2003).

## 4.2. Diagnóstico

Os meios de diagnósticos para endometrite equina são: palpação trans-retal, ultrassonografia (CAMOZATTO et al., 2009), vaginoscopia, citologia uterina (LEBLANC et al., 2007), biópsia endometrial (SCHOON & SCHOON, 2003) e/ou cultura uterina seguida de antibiograma (RIDDLE et al., 2007).

O diagnóstico de endometrite na égua muitas vezes é realizado aleatoriamente durante o ciclo estral de acordo com a necessidade dos exames. O diagnóstico mais utilizado consiste na obtenção de amostras uterinas para realização de citologia, cultura e/ou biópsia endometrial (SCHOON & SCHOON, 2003; RIDDLE et al., 2007).

### 4.2.1. Citologia uterina

De acordo com Riddle et al (2007), o método de diagnóstico para endometrite por meio de citologia uterina mostrou-se superior à cultura uterina isolada quanto à identificação de éguas com endometrite.

A técnica de citologia uterina foi estabelecida inicialmente na década de 1960, destacando-se a adequada acessibilidade da técnica empregada à campo, e praticidade na execução. Tais atributos levam à resultados relativamente rápidos, sendo utilizada para verificação da presença de células inflamatórias (neutrófilos) no endométrio, facilitando assim, a conduta terapêutica (KNUDSEN & SOLLEN, 2007; CAMOZZATO et al., 2009).

A Tabela 1 traz uma compilação de diferentes métodos de interpretação das preparações citoscópicas quanto ao número de neutrófilos de acordo com a literatura.

**Tabela 1:** Avaliação e contagem de polimorfonucleares neutrófilos nas preparações citoscópicas para classificação da endometrite em éguas.

CLASSIFICAÇÃO	AUTOR
> 1 neutrófilo por 5 campos (240x)	Knudsen (1964)
Proporção de células endometriais e neutrófilos >10:1	Asbury (1982)
> 5 neutrófilos por campo	Brook (1985)
< 15 células endometriais para 1 neutrófilo	Ley (1986)
> ou = 3-10% das células são neutrófilos	Crickman and Pugh
> ou = 2% das células são neutrófilos	Ball et al. (1988)
> ou = 1 neutrófilo por campo (400x)	Purswell (1989)
> 0,5% de neutrófilos	Ricketts e Mackintosh (1989)
> 0,5% de neutrófilos	Nelsen (2005)
> 2% de neutrófilos	Aguiar et al (2006)
> 2 neutrófilos em 10 campos (1000x)	Riddle et al. (2007)
> ou = 1 neutrófilo por campo, em 10 campos (1000x)	LeBlanc et al (2007)
> 2 neutrófilos por campo (400x)	Burleson et al. (2010)
> 2% de polimorfonucleares (1000x)	Overbeck et al. (2011)
> 2 neutrófilos por campo e > 0,5% de neutrófilos (1000x)	Cocchia et al. (2012)

**Fonte:** Card (2005) modificado

De acordo com Riddle et al (2007), o exame citológico pode ser baseado na proporção encontrada entre células endometriais e neutrófilos, ou na quantidade de neutrófilos por campo, ou ainda na quantidade total de neutrófilos de uma amostra.

Walchli et al. (1993) afirma que a obtenção de amostras para citologia durante o período do estro parece favorecer o material coletado, embora este exame possa ser realizado em qualquer fase do ciclo estral, sendo escassas as informações sobre a superioridade de amostras obtidas em fases específicas.

#### 4.2.1.1. Citologia uterina por escova ginecológica

A obtenção de material uterino pela escova ginecológica é prática e permite interpretação dos resultados imediatamente após a preparação citoscópica (ALVARENGA & MATTOS, 1991). Embora a amostra seja obtida de um único ponto do endométrio, o resultado é representativo da condição uterina, sendo a técnica de escolha para a avaliação da condição uterina de éguas a campo (OVERBECK et al., 2011; COCCHIA et al., 2012). Em bovinos, a citologia uterina por meio de escova ginecológica pode ser utilizada, mostrando-se superior à técnica de lavado uterino de baixo volume quanto à praticidade, integridade celular e detecção de polimorfonucleares (KASIMANICKAM et al., 2005).

Segundo Pascottini et al. (2015) não existe uma técnica ideal de citologia uterina, cada técnica apresenta suas vantagens e desvantagens, embora a citologia uterina por meio de escova ginecológica seja a técnica de eleição em bovinos.

Como observado por Bohn et al. (2014), para a execução do lavado uterino são necessárias pelo menos duas pessoas, já para a colheita de material uterino pela escova ginecológica uma única pessoa é capaz de realizar o procedimento.

A técnica por escova ginecológica tem sido preconizada. As classificações obtidas para leitura de lâminas preparadas a partir de material obtido por citologia uterina com a escova ginecológica são direcionadas ao número de neurófilos proporcionais às células epiteliais (LEBLANC et al, 2007).

#### 4.2.1.2. Citologia uterina pelo lavado de baixo volume

Jorge et al (2013) utilizou a metodologia de baixo volume de fluido para infusão e subsequente recuperação para coleta de material uterino na égua, previamente descrita por Cocchia et al. (2012).

Assim, Jorge et al (2013) descreve a técnica de lavado uterino de baixo volume, com o sistema fechado (3 vias) de lavagem uterina, por meio de sonda



Bivona<sup>®</sup>, e condutos siliconizados. Para o procedimento preconiza-se a infusão de aproximadamente 100 mL de solução fisiológica e, posteriormente, realiza-se a massagem trans-retal do útero para facilitar a recuperação do volume da solução infundida.

Completando as informações, Jorge et al (2013) diz que na técnica de lavado uterino de baixo volume convencional, a solução uterina recuperada em tubo graduado é homogeneizada e imediatamente transferida para tubos de 50 mL tipo Falcon<sup>®</sup>, sendo armazenada a 4°C, seguida de centrifugação (400 rpm por 10 minutos) e confecção das preparações citoscópicas. Após a obtenção do *pellet*, o sobrenadante é descartado, remanescendo 2 mL para homogeneização e extensão do mesmo sobre a superfície da lâmina e posterior coloração.

Cocchia et al. (2012) realizou um estudo em éguas com infertilidade crônica, comparando os resultados de citologia uterina por meio de escova ginecológica, swab uterino e lavado uterino de baixo volume. Nesse referido estudo observou-se superioridade quanto ao diagnóstico preciso nas amostras obtidas por meio de escova ginecológica e lavado uterino quando comparadas à técnica do swab. As lâminas com maior celularidade foram obtidas pela escova ginecológica e o maior percentual de polimornucleares foi encontrado nas lâminas obtidas por meio de lavado uterino.

#### 4.2.1.3. Citologia uterina e preparação citoscópica por meio de citocentrifugação

A citocentrifugação é uma técnica bastante utilizada em lavados broncoalveolares de equinos, por promover a concentração das células e preservar sua morfologia, facilitando a avaliação da lâmina ao microscópio (BIAVA et al., 2005).

Jorge et al (2013) apresentou resultados de citologia uterina em éguas com emprego da citocentrifugação durante as preparações citoscópicas após a obtenção do lavado de baixo volume. A técnica permitiu maior concentração celular a partir dos *pellets* formados após a sedimentação do baixo volume de fluido coletado. Para tanto, utilizou-se a citocentrifugação do lavado, no qual uma alíquota do material submetido à centrifugação anterior foi citocentrifugada a 1200 rpm durante 5 minutos originando duas áreas microcirculares sobre a preparação citoscópica.

O estudo de Jorge et al (2013) comprovou que o lavado uterino submetido à citocentrifugação permitiu a detecção de maior percentual de neutrófilos do que o lavado submetido apenas à centrifugação convencional. Nesse estudo os autores

ênfâtizaram a contribuição da citocentrifugação para melhor eficácia na interpretação do diagnóstico citológico do lavado, o qual foi superior quando a concentração da celularidade presente na amostra.

#### 4.2.2. Ultrassonografia

A ultrassonografia foi utilizada na medicina veterinária a partir da década de 80, aumentando a eficácia dos exames clínicos e possibilitando observar sinais precisos sobre a evolução do trato reprodutivo (DUARTE et al, 2002).

A ultrassonografia é baseada no princípio de altas ondas sonoras de frequência produzidas por cristais piezoelétricos em um transdutor. Como as ondas sonoras são propagadas através de tecidos, uma proporção é refletida de volta para o transdutor, convertida em impulsos elétricos e exibidos em uma tela. Portanto, o transdutor é um transmissor e receptor de som. A magnitude das ondas de som refletidas é diretamente proporcional à diferença de densidade na interface, ou junção de dois tecidos. As estruturas cheias de fluidos aparecem pretas ou anecóicas na imagem (MC KINNON et al., 1987).

O autor acima ainda explica que o transdutor deve ser protegido pela mão do examinador para prevenir traumatismo na parede retal e o mesmo deve ser bem lubrificado. O cuidado deve ser tomado para evitar o material fecal associado ao transdutor. Depois de retirar o material fecal do reto, a sonda é introduzida e movida através do trato reprodutivo. A presença de ar no reto resulta em uma imagem distorcida, dificultando a visualização adequada das estruturas.

Na EPPC há maior necessidade da avaliação por meio da ultrassonografia devido ao acúmulo de fluido e a necessidade de tratamento imediato (PYCOCK et al., 1997; VANDERWALL & WOODS, 2003).

Em relação à aplicação da ultrassonografia Doppler na avaliação uterina na reprodução equina, foi possível reavaliar conceitos antes considerados definitivos quanto à fisiologia da reprodução. Essa técnica demonstrou ser efetiva e prática para a avaliação não invasiva e em tempo real da perfusão vascular do trato reprodutivo de equinos (GINTHER, 2007).

A técnica de ultrassonografia Doppler apresenta três modos de ação distintos: modo-B, modo-Doppler e modo-Espectral. O modo-B utiliza escalas de cinza e é primordialmente empregado para a identificação anatômica de estruturas a serem avaliadas posteriormente pelos modos coloridos. Através do modo-Doppler,

subdividido em funções color e powerflow, é possível estimar a perfusão sanguínea tecidual, levando-se em consideração a percentagem de tecido com pixels coloridos durante o exame. Já o modo-espectral fornece valores exatos de velocidades de fluxo sanguíneo e índices Doppler vasculares e teciduais (GINTHER & MATTHEW, 2004).

A adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo durante o exame espectral é dependente da correta angulação (ângulo Doppler) entre o transdutor e o vaso sanguíneo avaliado (GINTHER, 2007).

Avaliações ovarianas e uterinas com o ultrassom modo Doppler permitem interpretações relevantes quanto à viabilidade de estruturas e sua perfusão. Avaliação de estruturas como o corpo lúteo, possível detecção da proximidade de ovulação nos folículos pré-ovulatórios, diferenciação entre folículos transicionais e folículos em progressão na estação reprodutiva são apenas alguns exemplos que vêm revolucionando os métodos diagnósticos na clínica reprodutiva equina (CAMOZATTO et al., 2009).

#### **4.3. O efeito da fase do ciclo estral no diagnóstico da endometrite na égua**

Arruda et al. (2001) descreve o intervalo entre uma ovulação e outra como ciclo estral. Na égua, o intervalo é equivalente a 21 dias em média, caracterizando essa espécie como poliéstrica estacional, que em função da latitude apresenta máxima atividade ovariana durante a primavera-verão. No inverno, a atividade é reduzida, conhecida como anestro sazonal.

Romano et al. (1998) relata a fase de estro como sendo uma fase de grande receptividade ao garanhão em algumas éguas, embora em outras, é perceptível apenas por meio da ultrassonografia (cio silencioso) com acompanhamento da dinâmica folicular ovariana. Nas éguas, a ovulação ocorre antes do final do estro (24 a 48 horas).

De acordo com Wingfield e Ricketts (1982), em citologias uterinas de éguas saudáveis polimorfonucleares não estariam presentes no útero, com exceção de momentos como: após o parto, após cobertura e nos primeiros cios após o anestro. Em relação à presença de fluido intrauterino nas éguas, este raramente é encontrado após deposição de sêmen no útero. No entanto, pode ser diagnosticado por ultrassonografia, avaliando a ecogenicidade e a longevidade de permanência do fluido quando presente (BURNS et al, 2000).

McKinnon et al. (1993) explica que o fluido é estéril, mas serve como meio de cultura para bactérias, as quais, adentraram o trato genital durante a cobertura ou inseminação, provocando então uma inflamação e ou infecção, podendo ter uma ação espermicida, inviabilizando a inseminação.

Se houver presença de fluido no útero após a ovulação, geralmente, a égua é susceptível à endometrite, presumindo-se que seja devido à produção excessiva de muco ou baixa contratilidade uterina, resultando em limpeza reduzida, ou ainda, problemas na reabsorção de vasos linfáticos (PYCOCK e NEWCOMBE, 1996; MALOUFI et al., 2002; BRINSKO et al., 2003; SERTISH, 2007;).

Durante o diestro na égua, fatores anatômicos como fechamento de cérvix e posicionamento uterino podem resultar em dificuldade na drenagem do fluido, com acúmulo do mesmo seguido por resposta crônica. Além dos fatores citados, éguas com urovagina e permanência de urina na região próxima ao óstio cervical aberto podem ser predispostas ao refluxo intrauterino (LEBLANC, 2010).

Brinsko et al (2003; 2011) afirma que pode haver entre o edema uterino, um acúmulo de 10 a 20 mm de fluido, no corpo do útero ou nos cornos, caracterizando como normal em éguas resistentes. Em contrapartida, em éguas susceptíveis, há acúmulo maior que 2 cm (20mm) de fluido intrauterino durante o período de estro.

Alterações quanto presença de ar de forma permanente ou esporádica podem estar presentes, especialmente durante o cio em éguas com alterações vulvo vaginais. A conformação perineal inadequada, angulação de vulva e região de corpo perineal com pouca musculatura são fatores passíveis de correção, os quais comprometem a sanidade uterina (MCKINNON et al.,1993).

As éguas com tais características anatômicas inadequadas quanto à vulva não demonstram sintomas quando estão em diestro. Tal manifestação é mais comumente intermitente e sugestiva de pneumovagina no estro. Apesar da inconstância dos sintomas de acordo com as fases, a simples presença de ar no útero consequente da má conformação vulvar é suficiente para levar a infertilidade (SILVA et al,1983).

A colheita de material no estro permite a detecção de um maior percentual de neutrófilos do que no diestro (JORGE et al., 2013). Fisiologicamente, a migração de neutrófilos para o lúmen uterino é maior sob a influência de estrógeno do que sob a influência de progesterona. Além disto, na fase de estro, o percentual de neutrófilos de até 3% é considerado normal por alguns autores (COUTO & HUGHES, 1984; KOZDROWSKI et al., 2015). Nesta fase, o útero está edemaciado e há uma maior

produção de muco, seguido por hiperemia, o que facilita a entrada de neutrófilos (EVANS et al., 1987; JONES et al. 1991).

No estro a cérvix encontra-se aberta, o que facilita a entrada de contaminantes, predispondo ao desenvolvimento de endometrite. Já, no diestro, a vascularização uterina é menor e a cérvix encontra-se fechada (BRINSKO et al., 2011).

#### **4.4. Ozonioterapia**

Na medicina veterinária, existe uma busca grande para novas formas alternativas de tratamento economicamente viáveis e eficientes. A ozonioterapia é um exemplo, e já vem sendo amplamente utilizada (OGATA & NAGAHATA, 2000; HERNÁNDEZ & GONZÁLEZ, 2001; GARCIA et al., 2004).

A terapia com O<sub>3</sub> é dispersa como método de tratamento na Medicina Veterinária, mostrando efeitos positivos em determinadas afecções, envolvendo uma variedade de sistemas como: esquelético, respiratório (TRAINA, 2008), digestório (ALVES et al., 2004) e glândula mamária (MOREIRA, et al., 2014). No entanto, relatos quanto ao efeito desta terapia no sistema reprodutivo na espécie equina são escassos.

Os benefícios do uso da ozonioterapia na clínica reprodutiva equina são limitados aos relatos de Médicos Veterinários, principalmente em relação à resposta endometrial.

A ozonioterapia utiliza uma mistura de oxigênio ozônio (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>) mediante a passagem de oxigênio puro por uma descarga elétrica de alta voltagem e alta frequência. Após penetrar no organismo, o O<sub>3</sub> é capaz de melhorar a oxigenação e, conseqüentemente, o metabolismo corporal (PÉREZ et al., 2003).

Além disso, a reação do O<sub>3</sub> com ácidos graxos insaturados das membranas celulares origina uma série de peróxidos hidrófilos, que estimulam a formação de substâncias desoxigenantes, que, ao atuarem sobre a oxiemoglobina, liberam oxigênio e, conseqüentemente, aumentam sua disponibilidade para os tecidos, favorecendo, assim, a regeneração. Também reduz a agregação plaquetária, além de atuar como antiálgico, anti-inflamatório e estimulante do sistema reticuloendotelial (HERNÁNDEZ & GONZÁLEZ, 2001).

Na prática veterinária, as vias de aplicação mais comumente utilizadas são a tópica e a intramamária (OGATA & NAGAHATA, 2000; CAMPS RAMÍREZ et al.,

2003). A via respiratória não está indicada, já que pode ocasionar lesões endoteliais, aumento da permeabilidade e inflamação local (NOA et al., 1989).

Bocci (2000), relata que a ação do O<sub>3</sub> se dá através do seu desdobramento em Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Produtos de Oxidação Lipídica (LOPs), podendo ser administrado aos animais por vias endovenosa, oral, intrauterina, intra-arterial, intramuscular, subcutânea, retal, auto-hemoterapia, intra-articular, insuflação retal e intramamária e através do uso tópico de água e/ou óleo ozonizados.

Em equinos, há relatos da sua aplicação em afecções locomotoras como na sinovite da bursa do osso navicular, na osteoartrite da articulação interfalangiana distal e na tendinopatia no local de inserção do tendão do músculo flexor digital profundo (PASTORIZA, 2002), em tratamento de processos isquêmicos (ALVES et al., 2004) e na diminuição dos efeitos negativos do metabolismo aeróbico/anaeróbico em condições de máximo esforço em animais de corrida (SCROLLAVEZZA et al., 1997).

Segundo Alves et al. (2004), a utilização do O<sub>3</sub> é uma possível alternativa no tratamento de equinos acometidos por abdome agudo, já que as propriedades bioquímicas do O<sub>3</sub> induzem à modulação de enzimas antioxidantes.

O uso do O<sub>3</sub> intrauterino em éguas tem potencial baseado no mecanismo de ação da forma gasosa, a qual promove a indução da ativação da fagocitose de neutrófilos (BOCCI et al., 1993 apud LARINI e BOCCI, 2005).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Tipo de pesquisa**

É uma pesquisa de caráter exploratório, incluindo revisões bibliográficas pertinentes ao tema e realização de procedimentos experimentais. A fase experimental foi realizada com o auxílio do Programa Institucional de Iniciação Científica PIBIC - 2016-2017 - CAMPUS DESCALVADO – (IC 37.2016).

A equipe é composta pela Orientadora: Profa. Dra Cássia Maria Barroso Orlandi MV, MS, PhD; Supervisão Geral e Co orientadora: Profa Dra Roberta Basile MV, MS, PhD; orientação Ozonioterapia. Os colaboradores são: Prof Dr. Vando Edésio Soares MS, PhD / orientações para análise estatística; Prof Dr. Darcio Zangirolami Filho MV, MS / auxílio na sedação e contenção das éguas no Hospital Veterinário da Universidade Brasil; Prof Dr. Marco Antonio Alvarenga / orientação na metodologia para confecção e leitura das lâminas - FMVZ- Reprodução Animal - Unesp – Botucatu, SP; Dra. Mariana Nagib Jorge / Médica veterinária residente Unesp – Botucatu, SP; Centro de Reprodução (CRIA Reprodução Equina) – Pratânia, SP / disponibilidade das éguas; Dra. Milena Machado / Médica veterinária responsável da CRIA Reprodução Equina; Dr. Vinícius Pereira / Médico Veterinário - Ultrassonografia e Tratamento com ozônio; Aline Lopes de Moraes / Técnica auxiliar - Ultrassonografia e tratamento com ozônio.

### **5.2. Aspectos éticos**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Brasil do departamento de Medicina Veterinária, protocolo nº 1-019/15 (ANEXO 1).

### **5.3. Local**

Parte do estudo foi realizada na Fazenda Santo Antônio de Palmares (Figura 1), pertencente ao município de Pratânia, SP; na qual localiza-se o centro de Reprodução “CRIA Reprodução Equina”. Esta propriedade possui infra-estrutura com 13 cocheiras, piquetes de tifton e um laboratório de reprodução.

Outra parte do estudo foi realizada na Universidade Brasil – Descalvado, SP utilizando-se as dependências do hospital veterinário (HV) como tronco de contenção equino, laboratórios de análises clínicas e microscopia para confecção e leitura das preparações citoscópicas. As duas éguas utilizadas no HV pertencem a universidade e estão destinadas a atividades práticas acadêmicas.



**Figura 1:** Fotografia da Fazenda Santo Antônio de Palmares, Centro de Reprodução Equina em Pratânia, SP.

**Fonte:** Arquivo pessoal

#### 5.4. Animais

Foram utilizadas oito éguas (Figura 2) receptoras de embrião, vazias desde a última estação reprodutiva; com idade entre cinco e dez anos, com peso entre 300 kg e 400kg, avaliadas com escore corporal entre 2 (dois) e 4 (quatro), na escala de 1 a 5 (WRIGHT & RUSSEL 1984).



**Figura 2:** Éguas utilizadas no experimento alojadas na Fazenda Santo Antônio de Palmares, Centro de Reprodução Equina em Pratânia, SP.

**Fonte:** Arquivo pessoal.



Outras duas éguas foram utilizadas para treinamento inicial, sem aplicação de  $O_3$ , apenas para execução dos procedimentos e leitura de lâminas, não fazendo parte das análises estatísticas do experimento. Essas éguas, com idade entre três a cinco anos, e peso variando entre 300kg e 350kg, classificadas com o escore corporal 3 (três) e estando vazias; encontravam -se alocadas no HV da Universidade Brasil, mantidas em piquetes no setor de grandes animais onde receberam feno, água e concentrado. Na fase de aprendizado e treinamento, tais éguas foram utilizadas como parte de um projeto piloto.

### 5.5. Instrumentação

Os equipamentos e instrumentos utilizados neste experimento foram:

- Tronco de contenção para equinos.
- Ultrassom: Ultrasonic transducer / Linear 5 - 10 MhZ (75 L50 EAV) Shenzhen Mindray, Biomedical electronics CO- LTD (Figura 3). DPS Mindray



**Figura 3:** Ultrassom Shenzhen Mindray, Biomedical electronics CO- LTD.

**Fonte:** Allbiz (2017).

- Gerador de ozônio: Bomba de pressão para administração do  $O_3$  (Figura 4).



**Figura 4:** Gerador de Ozônio.

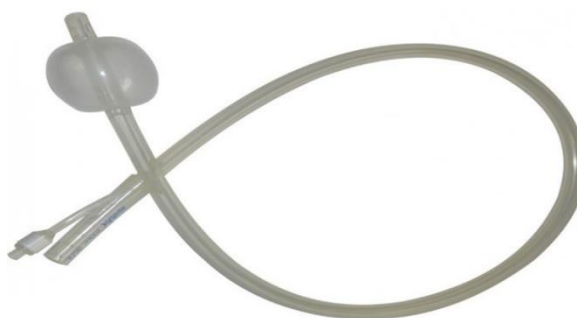
**Fonte:** Ozone Life (2017).

- Cilindro de oxigênio (Figura 5).



**Figura 5:** Gás cilindro de Ozônio.  
**Fonte:** Ozonic (2017).

- Sonda de silicone Bivona®: Individual e estéril para aplicação do gás intrauterino (Figura 6).



**Figura 6:** Sonda modelo Bivona® utilizada no experimento.  
**Fonte:** Kajavet (2017).

- Equipamentos para coleta: Haste de aço inoxidável com mandril (Figura 7); Escova ginecológica (Figura 8).



**Figura 7:** Pinça de inox com haste dupla para exame de citologia uterino na égua. (Botupharma®; Ltda; Botucatu, SP, BRASIL).  
**Fonte:** Arquivo pessoal



**Figura 8:** Escova ginecológica.

**Fonte:** Arquivo pessoal

- Microscópio: Microscópio Bioval modelo L2000A. Sala de microscopia do campus, Descalvado. Câmara acoplada ao microscópio para discussão e avaliação das lâminas com orientação.
- Material de consumo: Luva de palpação; Lubrificante; Ataduras (isolamento de cauda); Clorexidina 2%; Sabão líquido neutro (detergente); Luva cirúrgica estéril;

## 5.6. Procedimentos

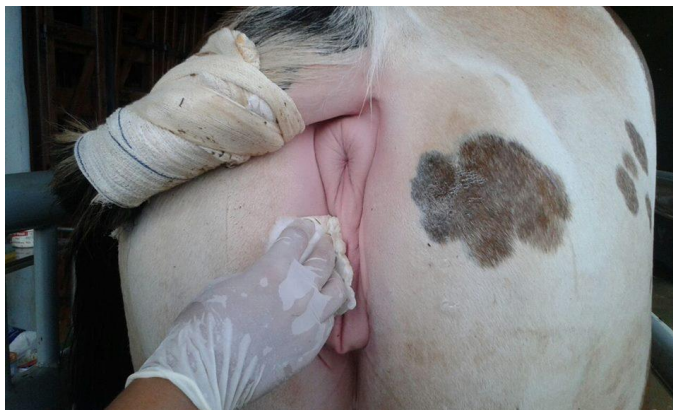
Os procedimentos descritos abaixo foram realizados gradativamente de acordo com a cronologia de execução pelos colaboradores, os quais exerceram suas funções previamente planejadas ao decorrer do projeto. (vide descrição equipe no tópico 5.1. Tipo de pesquisa)

### 5.6.1. Exames de Triagem

Como parte da triagem as éguas foram submetidas à palpação trans retal após limpeza do reto com remoção das fezes e realização da ultrassonografia, a fim de determinar a fase do ciclo estral e as características do trato reprodutivo (útero e ovários) e identificação do ciclo estral de cada égua, as quais foram documentadas como variáveis para a análise da condição uterina e da ciclicidade para avaliação do trato reprodutivo.

### 5.6.2. Preparação da região perineal

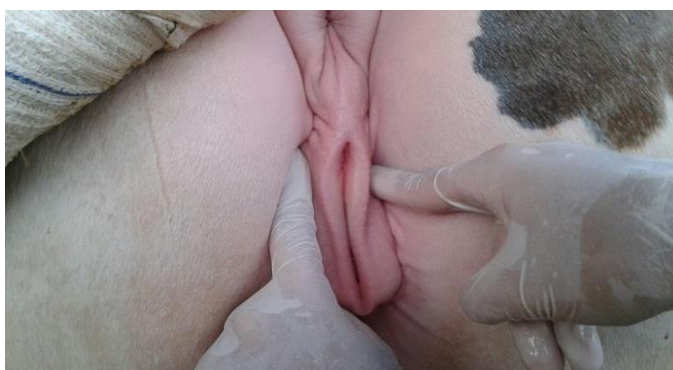
Antes do início da coleta do material uterino, a égua teve sua cauda isolada lateralmente por meio de ataduras, promovendo uma melhor assepsia da região perineal (sabão neutro e clorexidina 2 %) e secagem como na Figura 9.



**Figura 9:** Assepsia da região perineal.  
**Fonte:** Arquivo pessoal

### 5.6.3. Avaliação externa da região perineal

A vulva foi classificada como adequada ou inadequada de acordo com o grau de angulação e conformação vulvar (Figuras 10, 11 e 12).



**Figura 10:** Procedimento de avaliação da conformação vulvar na égua com dedo indicador e observação da extensão de abertura na comissura dorsal e coaptação dos lábios vulvares.  
**Fonte:** Arquivo pessoal.



**Figura 11:** Procedimento de avaliação da conformação vulvar na égua com dedo indicador e observação da angulação dos lábios vulvares.

**Fonte:** Arquivo pessoal.



**Figura 12:** Região perineal após higienização para início da abordagem trans-vaginal do trato reprodutivo.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 5.6.4. Exame trans-retal

Durante o exame trans retal avaliou-se o tônus e consistência uterina, consistência de cérvix e presença e tamanho de folículos ovarianos.

O tônus uterino foi classificado de 1 a 4, conforme os seguintes parâmetros (Adaptado de CAIADO et al, 2007):

- Tônus 1 - mínimo tônus do anestro até o início da atividade cíclica; o formato e a consistência do útero não estavam bem definidos ao exame de palpação retal;
- Tônus 2 - tônus proporcional pela fase estrogênica do ciclo estral (estro); útero com consistência macia e formato quase tubular, com contratilidade ainda não perceptível ao toque;

- Tônus 3 - tônus da fase progesterônica do ciclo estral (diestro); útero com formato tubular bem definido, com aumento do tônus e da consistência e contratilidade uterina perceptível ao toque;
- Tônus 4 - máximo tônus do início da prenhez, após o 13º dia; contratilidade uterina mais perceptível ao toque e útero em formato tubular e consistência mais firme.

De acordo com a tonicidade, a cérvix foi classificada como firme ou relaxada e de acordo com o exame digital no momento de aplicação do ozônio a mesma foi classificada como aberta ou fechada. A abertura da cérvix foi constatada pela sua flacidez e flexibilidade ao exame digital. O fechamento foi observado pelo formato tubular e pela consistência firme ao exame tanto digital quanto trans retal.

#### 5.6.5. Exame ultrassonográfico

O exame ultrassonográfico teve como objetivo avaliar a condição uterina, de acordo com a detecção e caracterização do aspecto de ecogenicidade do fluido, presença ou ausência de ar no lúmen uterino, grau de edema relacionado à ciclicidade e resposta inflamatória exacerbada. Este exame é de suma importância embora apenas contribua para o diagnóstico sugestivo da endometrite.

A classificação do edema uterino foi realizada de acordo com Pelehach et al. (1961), com algumas modificações:

- Grau 0: superfície homogênea sem áreas anecóicas e sem definição de dobras endometriais.
- Grau 1: imagem com heterogenicidade, mas ainda sem definição de dobras endometriais.
- Grau 2: aumento da anecogenicidade com início do aparecimento das dobras endometriais.
- Grau 3: imagem extremamente heterogênea marcada por lacunas de fluido representada por grandes áreas anecóicas.

Dessa forma, realizou-se tabelas com descrições específicas sobre cada égua e em cada momento do tratamento.

#### 5.6.6. Protocolo experimental

A insuflação intrauterina pela sonda modelo Bivona® consistiu da mistura de oxigênio-ozônio durante 3 dias consecutivos (com intervalo de 24 horas) na concentração de 52 microgramas/ml, administrados em 10 min ao fluxo de 0,12 l/min. Por não haver estabelecimento de dose definida para infusão intrauterina equina na literatura acadêmica, a concentração utilizada no presente estudo foi definida de acordo com relatos de profissionais que utilizam o O<sub>3</sub> empiricamente a campo nas doses de no mínimo 30 e no máximo 70 microgramas/ml, portanto optou-se pela média ao redor de 50 microgramas/ml,

#### 5.6.7. Realização da Ozonioterapia e frequência dos tratamentos

Para exposição do endométrio ao O<sub>3</sub> realizou-se a introdução da sonda dotada de balão inflável; modelo Bivona®, assegurando de certa forma a permanência do gás infundido no lúmen do útero.

A sonda foi introduzida no útero após identificação do óstio externo da cérvix, via exame digital trans vaginal com direcionamento da ponta da sonda para dentro do lúmen do útero, posicionando e preenchendo o balão com ar. A sonda foi conectada ao equipamento para liberação do O<sub>3</sub>, previamente calibrado para o volume proposto durante o protocolo acima citado.

Os quadros abaixo representam os momentos de avaliação desde o início dos exames até a última avaliação ultrassonográfica:

O Quadro 1 abaixo descreve o D0 (dia 0) como sendo o primeiro exame, (triagem). Neste momento inicial realizou-se a ultrassonografia e coleta da primeira amostra de citologia uterina. Os tratamentos com O<sub>3</sub> foram realizados no dia D2, D3 e D4 (três dias consecutivos com intervalos de 24 horas) em cada égua, conforme demonstrado no quadro 1. No D2 (dia 2) realizou-se o primeiro tratamento com O<sub>3</sub> após 48 horas da triagem. No D3 (dia 3) realizou-se o segundo tratamento com O<sub>3</sub> após ultrassonografia e avaliação do trato reprodutivo. No D4 (dia 4) realizou-se o terceiro tratamento com O<sub>3</sub> após ultrassonografia, avaliação do trato reprodutivo e coleta da segunda citologia uterina. No D5 (dia 5) realizou-se a ultrassonografia, avaliação do trato reprodutivo e coleta da terceira citologia uterina. No D10 (dia 10) realizou-se a ultrassonografia e avaliação do trato reprodutivo.

**Quadro 1:** Cronologia dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental.

<b>D0</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>	<b>D5</b>	<b>D10</b>
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------

D0: triagem e primeira citologia 1; D2: primeiro tratamento; D3: segundo tratamento; D4 terceiro tratamento e segunda citologia; D5 terceira citologia; D10: Avaliação do trato reprodutivo final.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 5.6.8. Citologia uterina pela técnica de escova ginecológica

A colheita de material uterino, por meio de escova ginecológica, consiste no acoplamento desta à pinça de citologia (haste de metal protegida por uma segunda haste circular, a qual recobre toda superfície da haste interna), com a ponta do dispositivo coberta pelo dedo polegar até a verificação da cérvix e seu posicionamento na superfície do lúmen uterino.

Após a preparação da haste (previamente flambada - álcool 92% e fogo em um recipiente durante 5 minutos), a mesma foi introduzida na vagina da égua com sua ponta protegida pela mão (luva plástica de palpação trans-retal e sobreposta por luva de látex estéril), a fim de evitar contaminação uterina ao adentrar ao vestíbulo vaginal (Figura 13), chegando-se ao óstio da cérvix. Este procedimento foi repetido a cada coleta de material uterino em cada égua avaliada.



**Figura 13:** Introdução da haste na vagina com sua ponta protegida pelo dedo indicador.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Após a introdução da ponta do instrumento dentro do lúmen uterino através da passagem pela cérvix; a haste de metal foi posicionada no corpo do útero e uma vez em contato com a superfície uterina, a escova foi exposta e girada consecutivamente três vezes para a obtenção do material.



A escova foi então introduzida novamente dentro da haste de metal, com auxílio de deslocamento caudal do mandril acoplado a escova. O instrumento foi então removido de dentro do trato genital da égua. Durante a remoção da mesma, a mão do examinador protegeu o instrumento ao longo do canal genital, verificando-se posteriormente o aspecto mucoso e coloração da luva e da escova ginecológica, os quais foram documentados.

#### 5.6.9. Confeção das lâminas

O material da escova foi transferido para uma lâmina, pressionando e girando a escova sobre a superfície da mesma. Realizou-se a secagem natural da lâmina para posteriormente ser processada no laboratório.

#### 5.6.10. Processamento laboratorial das amostras de citologia

Após a secagem do material previamente depositado na superfície da lâmina, a mesma foi submetida à coloração rápida tipo, Panótico® (Figura 14), com utilização de três recipientes, com capacidade de imersão das lâminas no seu interior para fixação e coloração.



**Figura 14:** Recipientes com soluções (Panótico Rápido) para coloração dos esfregaços obtidos pela citologia uterina.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

- Recipiente 1: solução de triarilmetano a 0,1%.
- Recipiente 2: solução de xantenos a 0,1%.
- Recipiente 3: solução de tiazinas a 0,1%.

As lâminas foram mergulhadas 20 vezes em cada recipiente, seguindo a ordem numérica dos mesmos, sendo então enxaguadas com água destilada.



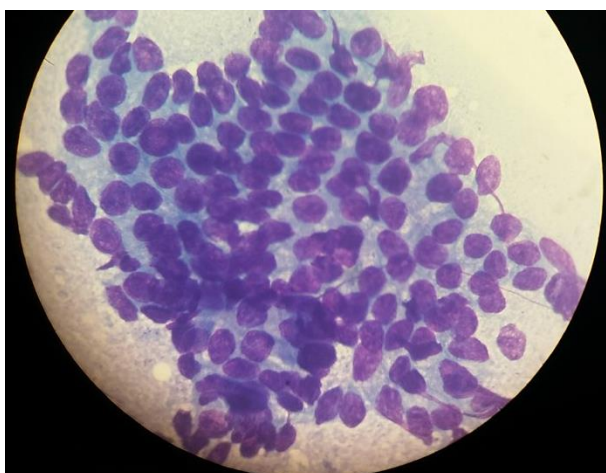
**Figura 15:** Lâminas coradas pelo Panótico Rápido.  
**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 5.6.11. Avaliações microscópicas das lâminas de citologia

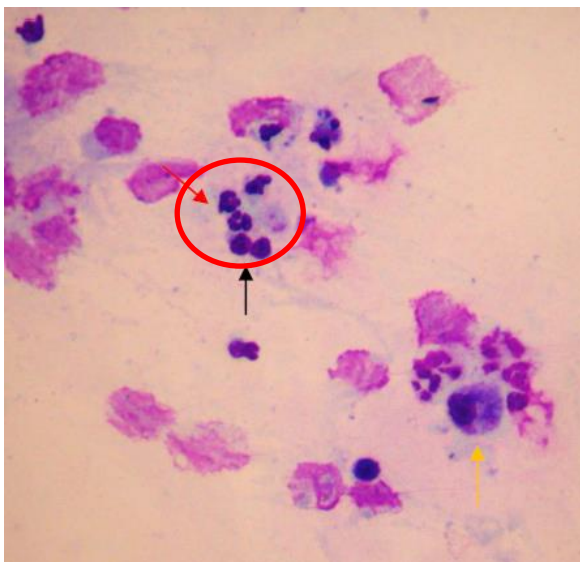
As lâminas coradas foram examinadas por microscopia óptica em aumento de 100 x (Figura 17) com imersão em óleo mineral para contagem e identificação das células (endometriais e neutrófilos) presentes nas amostras.

Para cada égua realizou-se a obtenção de 3 lâminas em cada momento (pré, durante e pós), totalizando 90 amostras avaliadas.

Durante a avaliação, foi quantificada a proporção de neutrófilos e células endometriais mediante a contagem de 300 células em um mínimo de 10 campos, evitando aglomerados celulares, a fim de que se pudesse obter a porcentagem de neutrófilos em cada lâmina.



**Figura 16:** Microscopia óptica com visualização de aglomerado de células endometriais na objetiva de 100x.  
**Fonte:** Arquivo pessoal.



**Figura 17:** Presença de neutrófilos (seta e círculo vermelhos) no epitélio de revestimento do lúmen uterino na égua. A seta preta e a amarela apontam outras denominações de células inflamatórias.

**Fonte:** Livro de Histologia Básica Junqueira & Carneiro (2013).

#### 5.6.12. Classificação das lâminas de citologia uterina

Considerou-se a quantidade relativa de neutrófilos em 300 células contadas, considerando no mínimo a presença de 10 células por campo e seguindo-se a classificação abaixo da Tabela 2:

**Tabela 2:** Classificação da endometrite de acordo com a porcentagem de neutrófilos.

Porcentagem de neutrófilos	Classificação
0 - 3%	Normal
3 - 10%	Endometrite leve (+)
10 - 30%	Endometrite moderada (+++)
30 - 50%	Endometrite moderada à severa (+++)
50 - 70%	Endometrite severa (++++)
> 70%	Endometrite muito severa (+++++)

**Fonte:** Adaptada de Brook (1993).

Esta classificação foi utilizada para todas as avaliações, nos três momentos (pré, durante e pós tratamento). Segue o detalhamento da classificação utilizada:

O grupo 0 foi formado por éguas que não apresentaram neutrófilos na amostra citológica, sendo esse representado por animais com citológico negativo, igual à normal.

O grupo 1 foi formado por éguas com percentual de neutrófilos  $\geq 3\%$  e  $< 10\%$ , representando o grupo positivo endometrite leve (+).

O grupo 2 foi formado por éguas com percentual de neutrófilos  $\geq 10\%$  e  $< 30\%$ , representando o grupo positivo endometrite moderada (++).

O grupo 3 foi formado por éguas que apresentaram percentual de neutrófilos  $\geq 30\%$  e  $< 50\%$  sendo esse representando o grupo positivo endometrite moderada à severa (+++).

O grupo 4 foi formado por éguas com percentual de neutrófilos  $\geq 50\%$  e  $< 70\%$ , representando o grupo positivo endometrite severa (++++).

O grupo 5, que foi formado por éguas com percentual de neutrófilos  $\geq 70\%$ , representando o grupo positivo endometrite muito severa (+++++).

Esta classificação auxilia na correlação dos resultados obtidos, sendo necessária a utilização de parâmetros uterinos e citologia endometrial no pré, durante e pós exposição ao O<sub>3</sub> intrauterino, para esclarecimento da real condição do útero no momento e a verificação da resposta ao fármaco.

## **5.7. Análise de dados**

### **5.7.1. Análise Estatística**

Os dados dos parâmetros uterinos, ciclicidade, assim como, porcentagem de neutrófilos observados nos momentos pré, durante e pós-tratamento nas éguas selecionadas foram submetidos em uma análise de agrupamento, no qual utilizou-se a Distância Euclidiana e o método de ligação foi o método *Complete Linkage*.

Em seguida, aplicou-se a análise de componentes principais com o objetivo de gerar o gráfico bidimensional das variáveis obtidas das éguas nos três momentos de avaliação. As supracitadas análises foram obtidas utilizando o software Statistica, versão 10 (2011).

A comparação entre as porcentagens média de neutrófilos foi realizada por meio de teste Qui quadrado.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de polimorfonucleares neutrófilos sofreu mudanças após a exposição ao O<sub>3</sub>, levando à variação na classificação clínica da endometrite, a qual apresentou progressão ao decorrer das avaliações (antes, durante e após O<sub>3</sub>).

Tais éguas inicialmente foram classificadas dentro da categoria normal a leve quanto a presença de neutrófilos no útero. No entanto, a magnitude desse aumento assim como permanência ou diminuição ao final do tratamento resultou em mudanças na classificação da endometrite. Tais mudanças foram influenciadas tanto pela fase do ciclo, como pela condição uterina inicial.

Éguas expostas ao O<sub>3</sub> durante o estro, apresentaram leve resposta representada por mudanças na quantidade de neutrófilos, resultando em progressão da classificação da endometrite clínica durante o tratamento. Esta progressão foi mantida ou regrediu para um quadro menos severo ao final do tratamento.

Éguas com ovulação detectada durante e ao final do tratamento, apresentaram magnitude de mudança quanto ao número de neutrófilos dependente do quadro inicial de classificação quanto à endometrite (normal à leve). Neste caso, éguas classificadas como normais inicialmente responderam com menor progressão do quadro clínico quanto aos neutrófilos, quando comparadas àquelas éguas comprometidas (endometrite leve).

A mudança no perfil de neutrófilos, representada pela progressão da classificação da endometrite como sendo clinicamente positiva foi observada na segunda citologia após a exposição ao O<sub>3</sub> em todas as éguas independente das fases do ciclo.

No entanto, a manutenção deste quadro progressivo quanto ao estabelecimento de resultado positivo para a endometrite ao final do tratamento (terceira citologia), assim como a magnitude do quadro (moderado ou severo) parece depender de fatores como: modulação hormonal exercida pela fase do ciclo estral e pela condição inicial da classificação endometrial na égua após a exposição ao O<sub>3</sub>.

Segundo Jorge et al (2013), citologias uterinas realizadas na fase de estro resultam em maior porcentagem média de neutrófilos quando comparadas àquelas realizadas na fase de diestro, o que demonstra a influência da fase do ciclo estral no momento de coleta. No entanto, o referido estudo não utilizou tratamentos uterinos, mas apenas foi executado com objetivo de obtenção de amostra para diagnóstico. De

qualquer forma o referido estudo mostrou a influencia da fase na qual se obtêm as amostras para interpretação do diagnóstico clínico.

No presente estudo, sem considerar a fase na qual a amostra foi obtida, as percentagens médias de neutrófilos e desvio padrão nos momentos antes, durante e após a exposição ao O<sub>3</sub> foram respectivamente: 3,3% ( $\pm$  4,5), 25,1% ( $\pm$  28,7) , 18,5% ( $\pm$  20,7) e não diferiram entre si ( $p \geq 0,05$ ).

Mesmo a despeito dos resultados de citologia após O<sub>3</sub> obtidos pelo presente estudo, faz-se necessário futuras pesquisas delineadas para a seleção da melhor fase do ciclo para o estabelecimento do tratamento.

Neste caso fatores como tônus de útero, patência de cérvix e a própria condição de maior ou menor susceptibilidade da égua em superar a presença de conteúdo exógeno no útero devem ser também considerados.

### 6.1. Escore da condição corporal das éguas

O escore da condição corporal (ECC) é uma avaliação das reservas corporais do animal e reflete o quanto ele está magro ou gordo, numa escala de 1 a 5 de acordo com os autores Wright & Russel (1984).

A avaliação do ECC baseia-se na inspeção (observação visual) e palpação de algumas regiões do corpo do animal, para verificação do conteúdo de massa muscular e gordura subcutânea. Essas regiões são as costelas, o lombo, a garupa e a inserção da cauda. A maioria das éguas encontravam-se com peso adequado e saudáveis. O ECC variou entre 2 e 4 na escala de 1 a 5, conforme na Tabela 3 a seguir:

**Tabela 3:** Identificação das éguas, raça e escore corporal.

ÉGUAS	RAÇA	ECC
n° 1	Mestiça crioula	3
n° 2	Mestiça crioula	4
n° 3	Mestiça crioula	3
n° 4	Mestiça quarto de milha	3
n° 5	Mangalarga	3
n° 6	Lusitana pura	2
n° 7	Mestiça quarto de milha	2
n° 8	Mestiça manga-larga	2

**Fonte:** Arquivo pessoal.

## 6.2. Estágio do ciclo estral

As éguas encontravam-se em diferentes fases do ciclo estral, tendo sido realizada coleta em momentos aleatórios em grupos retrospectivamente observados como sendo: “não cíclicas” ou “voltando ao cio” (início de estro); “final de estro” e diestro (ovulações detectadas durante o tratamento), como descritos na Tabela 4:

**Tabela 4:** Ciclicidade de cada em égua no pré tratamento, pós primeiro e segundo tratamento, pós terceiro tratamento e após 4 dias do último tratamento.

ÉGUAS ID	PRÉ	DURANTE	PÓS	FINAL
n° 1	1	1	1	1
n° 2	2	2	2	3
n° 3	1	1	1	1
n° 4	1	2	2	2
n° 5	1	1	2	2
n° 6	1	1	1	1
n° 7	2	2	3	3
n° 8	2	3	3	3

1 = não cíclicas/ início de estro (CL antigo, fol <20); 2 = Final de estro (Fol >20 à 40); 3 = diestro (CL novo).

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Pode-se observar que três éguas (n° 1, 3 e 6) não ciclaram (classificação 1) no momento pré até o final do tratamento. Três éguas (n° 2, 7 e 8) apresentaram cio já no exame de triagem, iniciando o diestro durante ou no final do tratamento (ovulação detectada). Duas éguas (n°4 e 5) apresentaram cio durante e ao final do tratamento, embora não ovularam até o final do estudo.

Apesar das fases não terem sido iguais para todas as éguas, as informações obtidas, permitem verificar as respostas de acordo com fases distintas, o que demonstrou a diversidade e caráter individual de cada égua quanto à resposta ao tratamento.

## 6.3. Classificação da endometrite

A classificação da endometrite nas avaliações foram realizadas a partir de informações adaptadas de Brook (1993) nos três momentos (pré, durante e pós tratamento).

Na Tabela 5 observa-se o número de éguas classificadas como normais ou portadoras de endometrite leve a severa, de acordo com o número de neutrófilos presentes nas preparações citoscópicas.

**Tabela 5:** Número de éguas com classificação da endometrite de acordo com a condição uterina baseada no número de neutrófilos, nos momentos pré, durante e pós tratamento com Ozonioterapia.

PRÉ	DURANTE	PÓS
NORMAL (n=5)	NORMAL (n=0)	NORMAL (n=1)
LEVE (n=2)	LEVE (n=4)	LEVE (n=3)
MODERADA (n=1)	MODERADA (n=1)	MODERADA (n=2)
MODERADA À SEVERA (n=0)	MODERADA À SEVERA (n=1)	MODERADA À SEVERA (n=1)
SEVERA (n=0)	SEVERA (n=2)	SEVERA (n=1)
MUITO SEVERA (n=0)	MUITO SEVERA (n=0)	MUITO SEVERA (n=0)

(n): número de éguas observadas com as respectivas classificações nos momentos definidos por cada coluna. Classificação utilizada para definição clínica da endometrite: Normal = citológico negativo para neutrófilos; Endometrite leve (+) = neutrófilos  $\geq 3\%$  e  $< 10\%$ ; Moderada (++) neutrófilos  $\geq 10\%$  e  $< 30\%$ ; Moderada à Severa (+++) = neutrófilos  $\geq 30\%$  e  $< 50\%$ ; Endometrite Severa (++++ = neutrófilos  $\geq 50\%$  e  $< 70\%$ , Muito Severa = neutrófilos  $\geq 70\%$ .

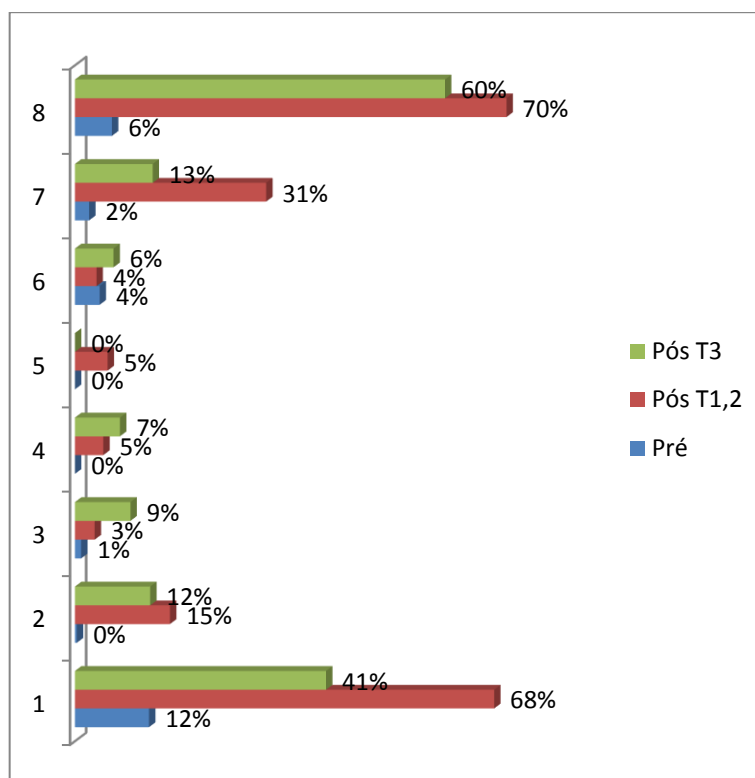
**Fonte:** Arquivo pessoal.

No momento pré tratamento (D0), cinco éguas (5/8; 62%) apresentaram citologia uterina normal enquanto apenas três éguas apresentaram certo grau de endometrite, embora considerada leve a moderada.

Após dois tratamentos com O<sub>3</sub>, as respostas observadas parecem estar relacionadas com a fase do ciclo na qual as éguas se encontravam ao início do tratamento e com a condição uterina inicial. Quatro éguas (50%) apresentaram resposta leve quanto ao grau de endometrite, enquanto outras quatro éguas (50%) apresentaram a classificação moderada à severa.

Após o terceiro tratamento, as éguas mantiveram o padrão de resposta observado durante o tratamento, com 50% classificadas como normais à leve e 50% de moderada à severa; sendo a única égua com citologia normal ao final do tratamento, não portadora de endometrite, desde o início do tratamento.





**Figura 18:** Porcentagem de neutrófilos observados na citologia uterina em éguas submetidas ao tratamento com ozônio nos momentos pré, durante (pós T1, T2) e pós tratamento (Pós T3).  
**Fonte:** Arquivo pessoal.

A resposta inflamatória representada pela porcentagem de neutrófilos presentes nas preparações citoscópicas (Figura 18) aumentou durante a exposição do útero ao O<sub>3</sub> em todas as éguas, atingindo porcentagens próximas a 70% apenas em 2 éguas, as quais caracterizam a endometrite muito severa.

No entanto, 50% das éguas (4/8) apresentaram uma resposta caracterizada como endometrite leve até 5% de neutrófilos, uma égua apresentou resposta moderada com 15% de neutrófilos e outra com 30% (moderada a severa).

De maneira geral observou-se aumento nas porcentagens de neutrófilos após dois tratamentos. No entanto, esta resposta foi mantida ou diminuiu após o terceiro tratamento com O<sub>3</sub>.

#### 6.4. Tônus uterino

O tônus uterino foi avaliado por meio de palpação uterina trans retal e os resultados encontram-se na Tabela 6 a seguir:

**Tabela 6:** Tônus uterino das éguas no decorrer dos tratamentos com Ozonioterapia.

ÉGUAS	PRÉ	PÓS T1	PÓS T2	PÓS T3	FINAL
n° 1	0	2	2	1	1
n° 2	1	2	2	2	1
n° 3	0	2	0	2	1
n° 4	3	2	1	1	1
n° 5	1	1	1	1	1
n° 6	0	0	1	0	0
n° 7	1	1	1	1	2
n° 8	1	1	2	2	1

0 = Flácido; 1 = Tônus 1; 2 = Tônus 2; 3 = Tônus 3. Pré = 48 horas antes do primeiro tratamento; Pós T1, T2, T3 = intervalos de 24 horas entre as avaliações, imediatamente antes dos tratamentos subsequentes e Final = 5 dias após o 3º tratamento.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Verificou-se éguas com o tônus uterino de flácido (classificação 0) à tônus 1 (classificação 1) no momento pré tratamento, com apenas uma égua (n° 4) com tônus 3 (classificação 3).

No final do tratamento, a maioria das éguas encontravam-se com o tônus uterino 1 (classificação 1), com apenas uma égua (n° 7) com magnitude de aumento do grau de 1 para 2 e outra égua (n° 6) que manteve sua classificação inicial 0.

O tônus uterino foi influenciado pela fase do ciclo (diestro) devido ao aumento de progesterona e possivelmente pela resposta individual a presença do O3. O tônus 1 ou 2 prevaleceu nas éguas que terminaram o tratamento ovuladas e as demais éguas apresentaram tônus 0 ou 1.

## 6.5. Tônus de cérvix

O tônus de cérvix foi avaliado por meio de palpação da cérvix pela via trans vaginal e os resultados encontram-se na Tabela 7 a seguir:

**Tabela 7:** Grau de relaxamento da cérvix no decorrer dos tratamentos com Ozonioterapia.

ÉGUAS	PRÉ	PÓS T1	PÓS T2	PÓS T3	FINAL
n° 1	1	2	3	3	3
n° 2	3	3	3	3	3
n° 3	1	2	2	3	3
n° 4	0	0	1	2	2
n° 5	0	2	2	3	3
n° 6	3	2	2	3	3
n° 7	1	1	3	2	2
n° 8	2	1	1	1	1

0 = Tônus aberta/flácida; 1 = Tônus 1; 2 = Tônus 2; 3 = Tônus 3 / máximo de fechamento. Pré = 48 horas antes do primeiro tratamento; Pós T1, T2, T3 = intervalos de 24 horas entre as avaliações, imediatamente antes dos tratamentos subsequentes e Final = 5 dias após o 3º tratamento.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Cinco éguas (n° 1, 2, 3, 5 e 6) apresentaram uma avaliação de máximo fechamento da cérvix no final do tratamento. As éguas (n° 2 e 6) mantiveram o tônus de cérvix do início ao final do tratamento, com pequenas oscilações no momento durante o tratamento.

As éguas (n° 4 e 7) apresentaram mudanças de classificação desde o momento pré tratamento até o momento final (5 dias após o último tratamento com O<sub>3</sub>).

Uma égua (n° 8) apresentou uma diminuição na classificação logo após a primeira aplicação de O<sub>3</sub>. A diminuição do tônus nessa égua ocorreu pela condição pré ovulatória onde a cérvix atinge o grau máximo de relaxamento fisiologicamente.

## 6.6. Presença de fluido

A presença de fluido foi avaliada por meio da ultrassonografia pela via trans retal e os resultados encontram-se na Tabela 8 a seguir:

**Tabela 8:** Classificação de acordo com a presença ou ausência de fluido no lúmen uterino das éguas no decorrer do tratamento com Ozônio.

ÉGUAS	PRÉ	PÓS T1	PÓS T2	PÓS T3	FINAL
n° 1	0	1	1	0	0
n° 2	0	1	0	0	0
n° 3	0	1	1	1	0
n° 4	0	2	0	1	0
n° 5	0	0	0	0	0
n° 6	2	1	0	1	0
n° 7	0	0	1	1	0
n° 8	0	1	0	0	0

0 = Ausência; 1 = Presença <1cm; 2 = Presença >1cm.

Pré = 48 horas antes do primeiro tratamento; Pós T1, T2, T3 = intervalos de 24 horas entre as avaliações, imediatamente antes dos tratamentos subsequentes e Final = 5 dias após o 3° tratamento.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Apenas uma égua (n°6) apresentou fluido no lúmen uterino no momento pré tratamento com classificação 2 (presença maior que 1cm). As demais, não apresentaram fluido.

Ao final do tratamento, todas as éguas não apresentaram nenhuma presença de fluido no lúmen uterino. Podemos dizer que o O<sub>3</sub> provoca a presença de fluido em algumas éguas durante o tratamento, mas no final, todas apresentaram classificação de ausência quanto ao fluido.

Embora o fluido represente possível comprometimento e seja utilizado a campo como sinal de anormalidade dependendo das dimensões observadas no lúmen uterino, não se pode afirmar que apenas a presença de fluido caracterize endometrite. O aspecto (ecogenicidade) e o volume de fluido pode sugerir comprometimento do endométrio e maior ou menor susceptibilidade pós contato com agentes patogênicos ou com o próprio sêmen.

A avaliação de fluido uterino é sem dúvida um diagnóstico complementar aos demais e necessita de acompanhamento sequencial e outros diagnósticos que possam somar às informações obtidas pela ultrassonografia, inclusive o exame semiológico (palpação trans retal).

## 6.7. Presença de ar

A presença de ar foi avaliada por meio da ultrassonografia pela via trans retal e os resultados encontram-se na Tabela 9 a seguir:

**Tabela 9:** Classificação de acordo com a presença ou ausência de ar no lúmen uterino das éguas no decorrer do tratamento com Ozônio.

ÉGUAS	PRÉ	PÓS T1	PÓS T2	PÓS T3	FINAL
n° 1	1	1	2	0	1
n° 2	0	0	0	0	1
n° 3	0	1	1	2	1
n° 4	1	1	1	1	1
n° 5	0	1	0	1	1
n° 6	0	0	2	2	1
n° 7	0	1	1	1	1
n° 8	0	1	2	2	2

0 = Ausente; 1 = Presente – pouco ar; 2 = Presente – muito ar.

Pré = 48 horas antes do primeiro tratamento; Pós T1, T2, T3 = intervalos de 24 horas entre as avaliações, imediatamente antes dos tratamentos subsequentes e Final = 5 dias após o 3º tratamento.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

No final do tratamento, todas as éguas apresentaram ar no lúmen uterino na classificação 1 (presente - pouco ar), com apenas uma égua (n°8) com classificação 2 (presente – muito ar), na qual iniciou o diestro durante o tratamento, com ovulação após o T1 e T2, possivelmente com aumento de progesterona sanguínea ao final do tratamento.

O presente estudo não avaliou mensurações hormonais, embora com esse resultado possa revelar a necessidade de estudos quanto à influência da fase do ciclo nas respostas individuais das éguas. Em outras palavras, a permanência de ar no útero, assim como a progressão deste quadro podem resultar do fechamento da cérvix devido ao início do diestro após a ovulação. Portanto, pode ser indicado considerar a fase do ciclo com relação a longevidade do estro e proximidade da ovulação durante o tratamento.

## 6.8. Edema de útero

O edema de útero foi avaliado por meio da ultrassonografia pela via trans retal e os resultados encontram-se na Tabela 10 a seguir:

**Tabela 10:** Classificação de acordo com a visualização do edema de útero das éguas avaliado por meio de ultrassonografia no decorrer do tratamento com Ozônio.

ÉGUAS	PRÉ	PÓS T1	PÓS T2	PÓS T3	FINAL
n° 1	0	3	0	1	0
n° 2	3	3	3	3	2
n° 3	1	0	2	2	0
n° 4	1	2	3	3	3
n° 5	3	3	2	2	3
n° 6	3	1	2	0	1
n° 7	0	3	3	1	1
n° 8	3	2	1	0	2

0 = Nada de edema; 1 = pouco edema; 2 = médio edema; 3 = forte edema

Pré = 48 horas antes do primeiro tratamento; Pós T1, T2, T3 = intervalos de 24 horas entre as avaliações, imediatamente antes dos tratamentos subsequentes e Final = 5 dias após o 3° tratamento.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Ao início do experimento, fase de triagem (Pré) observou-se variações quanto à presença e grau de edema uterino, o que foi resultado das diferentes fases do ciclo nas quais as éguas se encontravam. No entanto, por tratar-se de éguas vazias na estação anterior, a presença de edema não acompanhada por fase do ciclo estral correspondente ao edema (estro) sugeriu estabelecimento de inflamação crônica desde o início dos tratamentos.

As variações de edema no decorrer dos tratamentos dependeram tanto da fase na qual a égua encontrava-se ao início do experimento, quanto a maior ou menor susceptibilidade da mesma ao acúmulo de fluido.

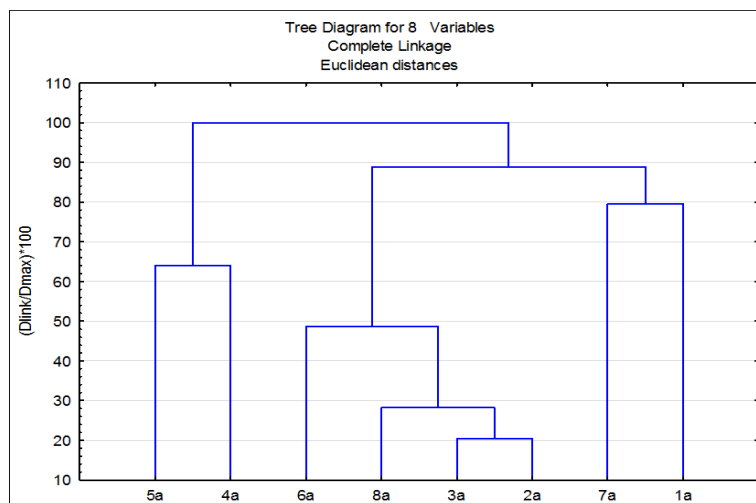
A resposta observada à presença do O<sub>3</sub> intrauterino quanto ao edema foi caracterizada na sua maioria por diminuição do grau de classificação do edema, com exceção de uma égua (n° 5), a qual encontrava-se no início do estro e progrediu quanto ao grau de edema como esperado fisiologicamente ao longo do estro.

As demais, como ovularam durante o tratamento ou permaneceram acíclicas apresentaram diminuição do edema, o que corresponde à progressão esperada.

Afirma-se que possivelmente o O<sub>3</sub> não leva ao edema inflamatório permanente e sim transitório, pois éguas com edema 3 encontravam-se no estro fisiológico durante e ao final do tratamento.

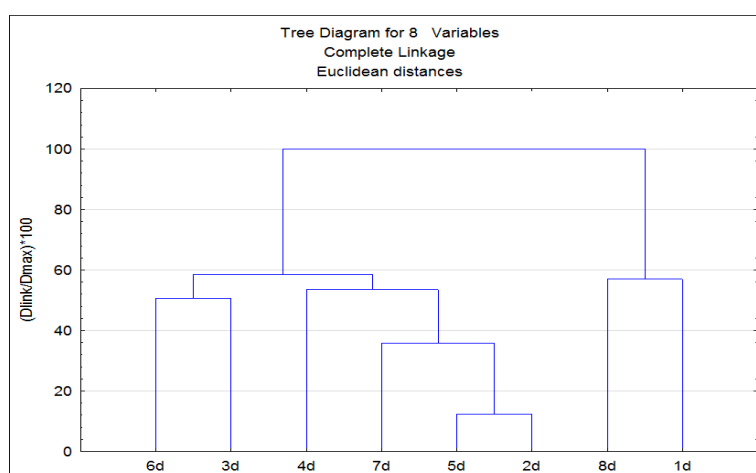
## 6.9. Dendogramas e projeção bidimensional das análises de agrupamentos

As análises possibilitaram o agrupamento das éguas de acordo com as respostas caracterizadas por parâmetros uterinos comuns observados no decorrer do tratamento. Dentre tais parâmetros, a presença de ar no útero, tônus uterino e ciclicidade exerceram maior influência sob as respostas aos tratamentos nos respectivos momentos como ilustrado pelos dendogramas (Figura 19 - 24).



**Figura 19:** Dendograma resultante da análise de agrupamento das éguas em função das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em oito éguas antes do tratamento intrauterino com Ozônio, pelo método “complete linkage” e considerando as distâncias Euclidianas.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

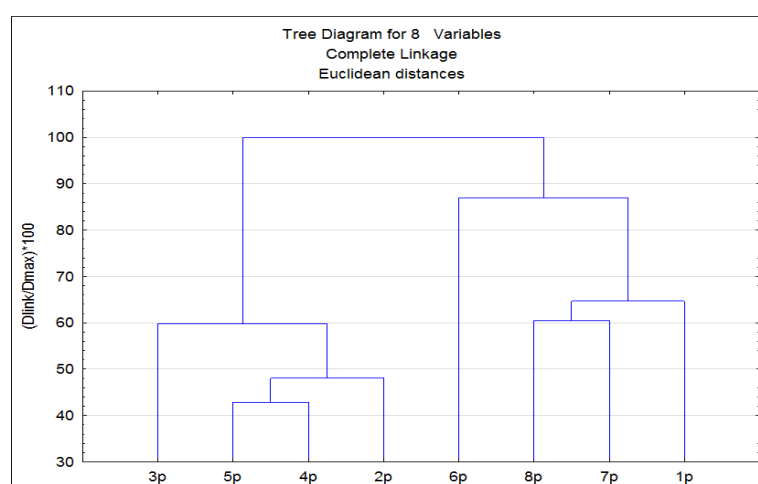


**Figura 20:** Dendograma resultante da análise de agrupamento das éguas em função das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em 8 éguas durante o tratamento intrauterino com Ozônio, pelo método “complete linkage” e considerando as distâncias Euclidianas.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

No dendograma acima (Figura 20) a resposta inflamatória acompanhada pelos parâmetros uterinos avaliados reúne as éguas n° 8 e n° 1 durante o tratamento, como ilustrado no dendograma acima. A condição de magnitude exacerbada da resposta neutrofílica (de 6 a 12% na triagem para 68 a 70% durante exposição ao O<sub>3</sub>) foi o fator possivelmente responsável pela característica comum entre essas éguas, o que dependeu diretamente da condição comprometida do útero já no momento de triagem.

As demais responderam de forma leve à moderada com perfil semelhante quanto à concentração de neutrófilos no lúmen e aos parâmetros uterinos observados.



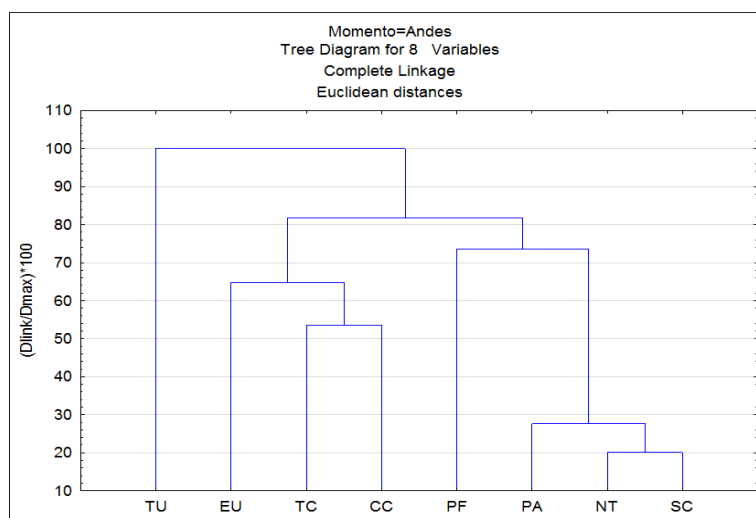
**Figura 21:** Dendograma resultante da análise de agrupamento das éguas em função das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em 8 éguas após o tratamento intrauterino com Ozônio, pelo método “*complete linkage*” e considerando as distâncias Euclidianas.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

O grupamento acima (Figura 21) observado no momento de avaliação pós O<sub>3</sub>, pode ser resultado da condição uterina inicial, na qual observou-se éguas comprometidas levemente ou moderadas (n°1, 6, 7 e 8) e as demais (n°2, 3, 4, e 5) foram inicialmente classificadas como normais.

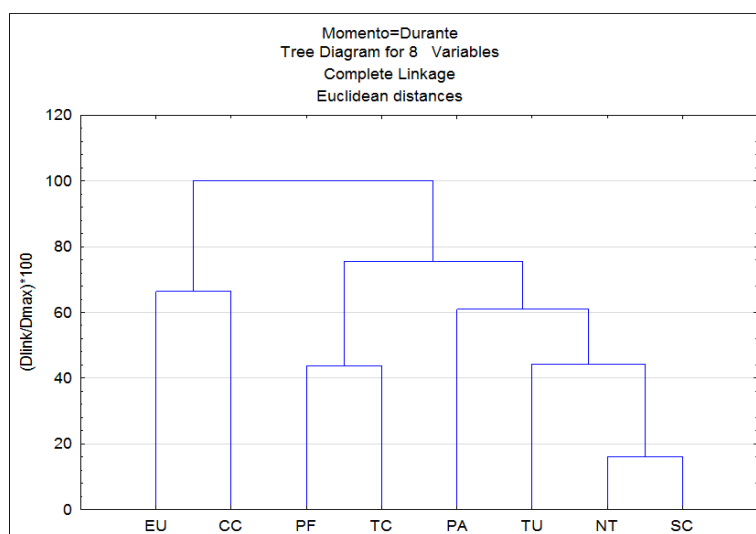
Portanto a condição uterina inicial influenciou a resposta das éguas permitindo identifica-las ao final do tratamento em dois grupos inicialmente caracterizados por classificação positiva e negativa.





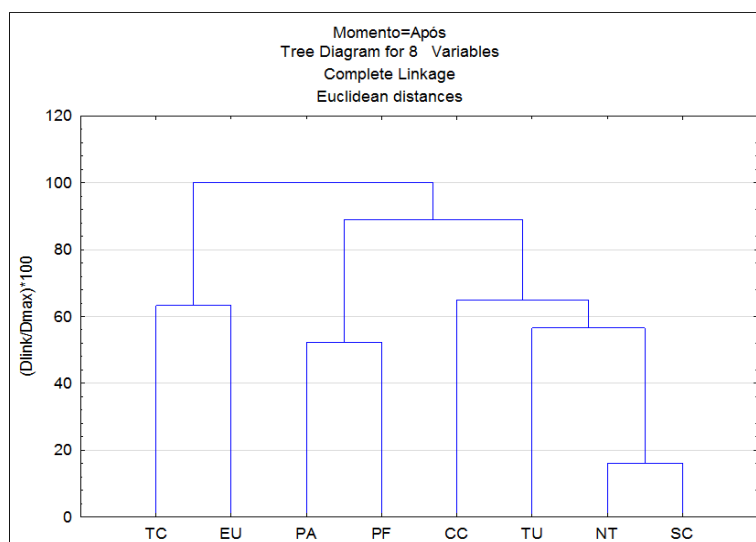
**Figura 22:** Dendograma resultante da análise de agrupamento das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em éguas antes do tratamento com Ozônio intrauterino, pelo método “*complete linkage*” e considerando as distâncias Euclidianas. TC = Tônus de cervix; SC = Escore corporal; PA = Presença de ar; PF = presença de fluido, TU = Tônus uterino; NT = Neutrófilos; EU = Edema uterino; CC = Ciclicidade.

**Fonte:** Arquivo pessoal.



**Figura 23:** Dendograma resultante da análise de agrupamento das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em éguas durante o tratamento com Ozônio intrauterino (após 2 tratamentos), pelo método “*complete linkage*” e considerando as distâncias Euclidianas. TC = Tônus de cervix; SC = Escore corporal; PA = Presença de ar; PF = presença de fluido; TU = Tônus uterino; NT = Neutrófilos; EU = Edema uterino; CC = Ciclicidade.

**Fonte:** Arquivo pessoal.



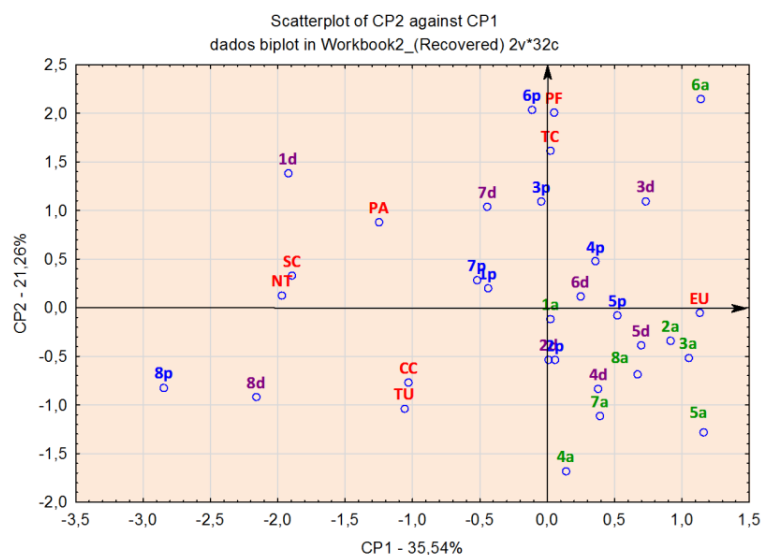
**Figura 24:** Dendrograma resultante da análise de agrupamento das variáveis relacionadas aos parâmetros uterinos, ciclicidade e porcentagem de neutrófilos em éguas após o terceiro tratamento com Ozônio intrauterino, pelo método “*complete linkage*” e considerando as distâncias Euclidianas. TC = Tônus de cervix; SC = Escore corporal; PA = Presença de ar; PF = presença de fluido, TU = Tônus uterino; NT = Neutrófilos; EU = Edema uterino; CC = Ciclicidade.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Os parâmetros de avaliação uterina agrupados no dendrograma (Figura 24) apresentam relações fisiológicas previstas como: edema, ciclicidade, tônus de cervix e de útero. Embora apenas o tônus uterino esteja relacionado com os demais parâmetros (presença de ar, fluido, neutrófilos e escore corporal).

A influência do escore corporal na possível entrada de patógenos pela vulva é notória, e está relacionada com a má conformação vulvar em éguas com região perineal pobre de musculatura. Esta conformação anatômica deficiente favorece a entrada de ar, de fluido, fezes e estabelecimento de possíveis processos inflamatórios.

A projeção bidimensional abaixo (Figura 25) permitiu agrupar éguas ao início do experimento (momento de triagem) no mesmo quadrante; representadas pelo número da égua e a letra (a).



**Figura 25:** Projeção bidimensional dos resultados obtidos nas análises das variáveis de parâmetros uterinos em função das éguas nos respectivos momentos. Número seguido de letras representam a identificação das éguas e o momento (a = pré tratamento; d = durante o tratamento; p = pós tratamento). Duas letras maiúsculas representam os parâmetros avaliados (TC = Tônus de cérvix; SC = Escore corporal; PA = Presença de ar; TU = Tônus uterino; NT = Neutrófilos; EU = Edema uterino; CC = Ciclicidade).

**Fonte:** Arquivo pessoal.

A identificação das éguas durante o tratamento revela a diversidade de respostas entre elas, pois as mesmas encontram-se distribuídas pelos quadrantes de forma desordenada sem homogeneidade.

Quanto aos parâmetros uterinos, presença de ar, ciclicidade e tônus uterino apresentam influência nas respostas ao tratamento com O<sub>3</sub>. Os demais parâmetros não parecem influenciar de forma significativa nos tratamentos.

## 7. CONCLUSÕES

A exposição do endométrio das éguas ao O<sub>3</sub>, independente da fase do ciclo resultou em mudanças nas porcentagens de neutrófilos, caracterizada por resposta inflamatória classificada de leve a severa durante o tratamento, permanecendo com a mesma classificação ou diminuindo a severidade da resposta ao final do tratamento, de acordo com a condição uterina inicial.

A presença de neutrófilos pode ser considerada como mecanismo de defesa, podendo atuar na resolução de afecções específicas embora sua manutenção possa caracterizar processo inflamatório progressivo.

A resposta uterina quanto ao aumento de neutrófilos foi mais evidente nas éguas que ovularam durante o tratamento, encontrando-se no início do diestro. Portanto, o aumento de neutrófilos com a exposição ao O<sub>3</sub>, parece ser hormonalmente modulado de acordo com a fase na qual é realizado o tratamento. Maior magnitude de resposta quanto à presença de neutrófilos foi verificada em éguas tratadas no diestro quando comparadas àquelas no estro.

Independente das fases do ciclo e da ciclicidade, ocorre resposta de infiltrado de neutrófilos após a insuflação de ozônio (pelo menos 2 tratamentos), com a magnitude da resposta possivelmente dependente da fase do ciclo e do status uterino inicial.

Apesar das fases do ciclo estral não terem sido iguais para todas as éguas, as informações obtidas permitem observar respostas uterinas de acordo com fases distintas, o que demonstra não apenas a diversidade e caráter individual da égua, mas o possível papel da fase do ciclo na viabilidade de execução do tratamento com O<sub>3</sub> e da sua influência nas respostas encontradas.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Camilo Castelo Branco (Universidade Brasil).

---



**UNIVERSIDADE CAMILO CASTELO BRANCO**  
**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: **Avaliação da Ozônioterapia intra-uterina na Égua**, protocolo nº 1-019/15, sob responsabilidade da Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório e com a Legislação vigente, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para uso científico de animais e o decreto nº 6.899, de 15 julho de 2009.

O projeto foi aprovado pela foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Camilo Castelo Branco (CEUA / UNICASTELO)**, em 15 de setembro de 2015

Fernandópolis, 16 de fevereiro de 2016

  
Prof. Dra. Dora Inês Kozusny-Andreani

Coordenadora da CEUA/UNICASTELO

CEUA/UNICASTELO

Cx Postal 121

Fernandópolis-SP

CEP: 15.600-000

Email: [comitê.eticaanimal.fer@unicastelo.br](mailto:comitê.eticaanimal.fer@unicastelo.br)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M.A.; MATTOS, M.C.F.I. **Eficiência da escova ginecológica "Cytobrush" na colheita de material endometrial de éguas.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 42, n. 1, p. 67-68, 1991.

ALVES, G.E.S.; ABREU, J.M.G.; RIBEIRO FILHO, J.D. et al. **Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em equinos.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.433-437, 2004.

ARRUDA, R.P., VISINTIN, J.A., FLEURY, J.J., GARCIA, A.R., MADUREIRA, E.H., CELEGHINI E.C.C. & NEVES NETO J.R. **Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos?** *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:233-239, 2001.

BIAVA, J.S.; GONÇALVES, R.C.; ZANOTTO, G.M. *et al.* **Uso da citocentrífuga e colorações especiais no exame citológico do lavado broncoalveolar em cavalos.** *Rev. Acad. Curitiba*, v.3, n.4, p.47-50, 2005.

BOCCI, V. **Ossigeno-ozonoterapia. Comprensione dei meccanismi di azione e possibilita terapeutiche.** Casa Editrice Ambrosiana, Milão. 324 p. 2000.

BOCCI, V., LUZZI, E., CORRADESCHI, F., PAULESU, L. and DI STEFANO, A. **Lymphokine Cytokine Res.** 12:121-126. 1993.

BOHN, A.A.; FERRIS, R.A.; MCCUE, P.M. **Comparison of equine endometrial cytology samples collected with uterine swab, uterine brush, and low-volume lavage from healthy mares.** *Vet. Clin. Pathol.*, v.43, n.1, p.594-600, 2014.

BRINSKO SP, RIGBY SL, VARNER DD, BALNCHARD TL. **A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis.** In: Proceedings of the 49th Annual Conv American Association Equine Practitioners; 2003. p. 363–5.

BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. *et al.* **Reproductive anatomy of the mare.** In: BRINSKO, S.P. (Ed). *Manual of equine reproduction.* 3<sup>rd</sup> ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011. p.1-9.

BRITO LFC, BARTH AD. **Endometritis in mares**. Large Animal Clinical Rounds, Western College of Veterinary Medicine., No 9, Vol:3. p.279-283. 2003

BROOK, D. **Uterine cytology**. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 246–53.

BURNS T, PIERSON RA, CARD CE. **Subjective and quantitative assessments of endometrial changes in mares inseminated with cryopreserved semen**. Proc Soc Theriogenol 2000;47.

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F.A., SILVA, J.F.S., FONTES, R.S. **Tratamento de éguas de 214 embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.36, n.2, p.360-368, 2007.

CAMOZZATO GC, MALSCHITZKY E, LOF H, DAVOLLI G, WOLF CA, MATTOS RC. **Inflamação uterina: ultra-som ou exame citológico?** Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. P. 145 -146. Belo Horizonte, CBRA. 2009.

CAMPS RAMÍREZ, A.M.R.; ELIAS-CALLES, B.; DENIS, R. et al. **Utilización del oleozon como alternativa de tratamiento en medicina veterinaria y su impacto en la salud animal**. In: FORUM DE CIENCIA Y TECNICA, 15., 2003, La Habana. Memorias... La Habana: [s.n.] 2003. 6p.

CARD, C. **Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares**. *Theriogenology*, v.64, p.580-588, 2005.

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

COUTO, M.A.; HUGHES, J.P. **Techniques and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare**. *Eq. Vet. Sci.*, v.4, p.265-273, 1984.

DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C. SILVA F.O.C. e; **Incidência de perda de prenhez até o 50° dia em éguas quarto de milha**. Ciência rural, Santa Maria, v.32, n.4, p643-647, 2002. ISSN 0103-8478. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/cr/v32n4/a16v32n4.pdf>>.

EVANS, M.J.; HAMER, J.M.; GASON, L.M.; IRVINE, A.C. **Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares.** *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.35, p.327-342, 1987.

GARCIA, C.A.; FARIA, A.B.; ROSSI, D.A. **Esterilização da microbiota bacteriana do idiossoma de *Boophilus microplus* pelo gás ozônio.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 34., 2004 São Luis. Anais... São Luis: CD Media Ltda 2004. CD-ROM.

GINTHER, O.J. et al. **Luteal blood flow and progesterone production in mares.** *Animal Reproduction Science*, v.99, p.213-220, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?>>. DOI:10.1016/j.anireprosci.2006.05.018.

GINTHER, O.J.; MATTHEW, D.U. **Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v.24 p.516-526, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?>>. DOI: 10.1016/j.jevs.2004.11.005.

HERNÁNDEZ O.; GONZÁLEZ, R. **Ozonoterapia En Úlceras flebostáticasin:** *Rev Cubana Cir*, 2001; v.40(2) p.123-129.

JONES, D.M.; FIELDEN, E.D.; CARR, D.H. **Some physiological and pharmacological factors affecting uterine motility as measured by electromyography in the mare.** *J Reprod. Fertil. Suppl.*, v.44, p.357-358, 1991.

JORGE MLN, ORLANDI CMB, MAGIONI GC, BARBOSA JC E SANTANA AE. **Exame citológico em éguas utilizando escova ginecológica e lavado de baixo volume durante o estro.** XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP.Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. ISSN 2178-860X, 10 a 12 de novembro de 2013, Barra Bonita . SP.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica – texto e atlas.** 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 556p. ISBN-10:85-277-2311-5.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T.F.; FOSTER, R.A. *et al.* **A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows.** *Can. Vet. J.*, v.46, p.255-259, 2005.



KENNEY, R.M. **Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.172, p.241-262, 1978.

KNUDSEN, O.; SOLLEN: **Methods for Taking samples from the uterus of mares and culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice.** *Theriogenology*; v. 68: p 395– 402. 2007.

KOZDROWSKI, R.; SIKORA, M.; BUCZKOWSKA, J. *et al.* **Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares.** *Anim. Reprod. Sci.*, v.154, p.56-62, 2015.

LARINI, A; BOCCI, V. **Toxicol.** *In Vitro.* 19:55-61, 2005

LEBLANC, M.M. **Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare.** *Reprod Dom Anim.* V. 45,21-27, 2010.

LEBLANC, MM, MAGSIC J, STROMBERG AJ. **Use of a low- volume uterine flush for diagnosing endometrites in chronically infertile mares.** *Theriogenology*, V. 68, p 403-412. 2007.

MALOUFI F, PIERSON R, OTTO S, BALL C, CARD CE. **Mares susceptible or resistant to endometritis have similar endometrial echographic and inflammatory cell reactions at 96 hours after infusion with frozen semen and extender.** In: *Proceedings of the 48th Annual Conv American Association Equine Practitioners*; 2002. p. 51–7.

MC KINNON AO, SQUIRES EL, CARNEVALE EM, HARRISON LA, FRANTZ DD, MCCHESENEY AE, SHIDELER RK. **Diagnostic ultrasonography of the uterine pathology in the mare.** *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners.*, p 605-622. 1987.

McKINNON, A.O. *et al.* **Equine Reproduction.** Pennsylvania: Lea & Febigen, 1993. 1137p.

MOREIRA, L. H., MORETTI, A. B., LIMA, C. J., KOZUSNY-ANDREANI, D. I., ZÂNGARO, R. A., RODRIGUEZ, Z. Z., ... & DE MELO, D. E. **Efeitos da aplicação**

- intra-mamária no tratamento de mastite em bovinos utilizando a ozonioterapia.** XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica –CBEB, 2014.
- NOA, M.; HERNÁNDEZ, F.; HERRERA, S. et al. **Observaciones morfológicas en ratas tratadas con ozono por vía intramuscular.** Rev. CENIC Cienc. Biol., v.20, p.20-23, 1989.
- OGATA, A.; NAGAHATA, H. **Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows.** J. Vet. Med. Sci., v.62, p.681-686, 2000.
- OLIVEIRA, R.A. **Endometrite.** Goiás: 2006. Acesso em: 07 de ago de 2017.
- OVERBECK, W.; WITTE, T.S.; HEUWIESER, W. **Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares.** *Theriogenology*, v.75, p.1311-1318, 2011.
- PASCOTTINI, O.B.; DINI, P.; HOSTENS, M. et al. **A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows.** *Theriogenology*, v.84, p.1438-1446, 2015.
- PASTORIZA, J.M. **El ozono - forma de aplicación tópica en distintas patologías, em equinos desportivos.** 2002. Disponível em: <<http://www.remonta.mil.ar/content/trabajo001.htm>>.
- PELEHACH, L. M.; GREAVES, H. E.; PORTER, M. B.; DESVOUSGES, A.; SHARP, D. C. **The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of cows.** *Nordisk Vet Med.* v. 13, p.449-456. 1961.
- PÉREZ, N.I.M.; GARCÍA, M.; CABEZAS, I. et al. **Ozonoterapia en el síndrome de malabsorción intestinal secundario a parasitismo por Giardia lamblia: Estudio preliminar.** Rev. Cubana Invest. Biomed., v.22, p.145-149, 2003.
- PYCOCK JF, PACCAMONTI D, JONKER H, NEWCOMBE J, VAN DER WEIJDEN G, TAVERNE M. **Can mares be classified as resistant or susceptible to recurrent endometrites?** *Pferdeheilkunde*, v,13, n5, p 431-436. 1997.

PYCOCK, J.F.; NEWCOMBE, J.R. **The relationship between intraluminal uterine fluid, endometritis and pregnancy rate in the mare.** Equine Pract., v.18, 19-22, 1996.

RIDDLE WT, LEBLANC MM, STROMBERG AJ. **Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice.** Theriogenology, v.68, p. 395- 402. 2007

ROMANO, M. A. et al. **Biologia reprodutiva de éguas: estudo do ciclo estral e momento de ovulação.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 35, n. 1, p. 25-28, 1998.

SAMPER, J.C. Uterine edema in the mare. In: SAMPER, J.C. (Ed). **Equine breeding management and artificial insemination.** 2<sup>nd</sup> ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2009. p.133-138.

SCHOON HA, SCHOON D. The category I mare (Kenney and Doig 1986): **Expected foaling rate 80-90%- fact or fiction?** Pferdeheilkunde 19[6],698-701. 2003.

SCROLLAVEZZA, P.; FERRARI, F.; MARTINI, F.M. et al. **Ozone treatment and blood lactate variation after thoroughbred racehorses.** In: WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION MONDIAL CONGRESS, 5., 1997, Padova. Proceedings... Padova: [s.n.] 1997. p.466.

SERTISH, P.L. In: SAMPER, J., PYCOCK, J., MCKINNON,A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction.** Intrauterine Diagnostic Procedures Sauders, St Louis, USA, p. 36-43,2007.

STATSOFT, INC. (2011). **Statistica** (Data analysis software system), version 10. Disponível em: <www.statsoft.com>.

TRAINA, A. **Efeitos biológicos da água ozonizada na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos.** São Paulo: Faculdade De Odontologia Da Usp, 2008.

VANDERWALL DK, WOODS GL. **Effects on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares.** J Amer Vet Med Assn 222[8], 1108-1110. 2003.

WALCHLI RO, KANZIG M, GYGAX A, CORBOZ L, RUESCH P. **The relationship between cycle stage and results of uterine culture in the mare.** Journal of Veterinary Medicine Series A, v.40, p.569-575.1993.

WINGFIELD DIGBY NJ, RICKETTS SW. **Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice.** J Reprod Fertil Suppl; 32:181–5. 1982.

WRIGHT, I. A.; RUSSEL, A. J. F. **Partition of fat, body composition and body conditin score in mature cows.** Animal Production, Edinburgh, v. 38, p. 23-32, 1984.