



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

EFEITO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NA QUEBRA DE BIOFILME
***IN VITRO* PRODUZIDO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE**
ÉGUAS SUSCETÍVEIS

ANTONIO BRITO DA SILVA FILHO

Recife, 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
ROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

EFEITO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NA QUEBRA DE BIOFILME
***IN VITRO* PRODUZIDO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE**
ÉGUAS SUSCETÍVEIS

ANTONIO BRITO DA SILVA FILHO

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro.

Recife, 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586e Silva Filho, Antonio Brito da
Efeito do óleo de girassol ozonizado na quebra de biofilme in vitro produzido por bactérias isoladas do útero de éguas suscetíveis / Antonio Brito da Silva Filho. - 2020.
131 f. : il.
- Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, 2020.
1. Ozônio. 2. Endometrite. 3. Peróxido . 4. Reprodução. 5. Equinos. I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orient. II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

EFEITO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NA QUEBRA DE BIOFILME
***IN VITRO* PRODUZIDO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE**
ÉGUAS SUSCETÍVEIS

ANTONIO BRITO DA SILVA FILHO

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcelo Mendonça
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

Prof. Dr. Jair Camargo Ferreira
Universidade de Franca (UNIFRAN)

*Dedico com todo meu carinho esse trabalho
ao meu avô Clementino Ferreira da Silva (in
memoriam) que nos deixou a saudade durante essa
caminhada.*

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

(São Francisco de Assis).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao meu bom Deus pelo dom da vida e por me proporcionar mais uma oportunidade em desenvolver esse mestrado, sem Ele e sem a interseção constante de Nossa Senhora, nada disso teria acontecido! Obrigado Senhor, por sua bondade e misericórdia infinita. *“Dai graças ao Senhor porque Ele é bom, grande é a sua misericórdia”*.

Agradeço aos meus pais, Maria de Lourdes Brito da Silva e Antonio Brito da Silva, por serem meu escudo e minha fortaleza, por não medirem esforços e caminharem ao meu lado na realização dos meus sonhos, saibam que os faço não por mim, mas por vocês! Obrigado por tudo! Palavras não são suficientes para expressar meu amor e gratidão.

Agradeço a minhas irmãs, Taciana Brito e Fabiana Brito e aos meus avós Josias Martins, Lenira Davi, Clementino Ferreira (in memoriam) e Severina Maria, por também estarem sempre ao meu lado, ajudando e me fortalecendo sempre que possível, principalmente nos dias que o fardo parecia um pouco mais pesado.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Ferrer, por ter confiado em mim e não medir esforços para me ajudar no que foi preciso. Muito obrigado por sua orientação e amizade, professor! Como também, não posso deixar de agradecer aos dois grandes Mestres que estiveram comigo durante todo esse período e pegaram na minha mão e me apresentaram o mundo fantástico da microbiologia. Obrigado Prof. Dr. Marcelo Mendonça e Prof. Dra. Elizabete Rodrigues, vocês foram fundamentais em tudo isso, obrigado pelos ensinamentos diários, puxões de orelha e dedicação para comigo, que Deus abençoe vocês.

Agradeço aos irmãos que a vida me deu que estão comigo desde a graduação e nunca se fizeram distantes, mesmo na ausência, obrigado pela força e por sempre estenderem as mãos quando eu mais precisei. Obrigado por tudo Juliana Pontes, Thamires Brito, Marcello de Pádua e Luíz Morotó.

Agradeço a todos meus amigos da República Casa da Chapa, Ian Francisco, Daniel Baia, Hugo Lira, João Felipe e Laerte Calado. Obrigado pela acolhida, amizade, pelas boas risadas e pela parceria construída. Contem sempre comigo.

Agradeço de coração a todos os que compõem o LABRAPE/LAPEMI por toda a ajuda, ensinamentos, companheirismo, momentos de alegrias, preocupações e tristezas, com vocês a caminhada se tornou mais leve e prazerosa, em especial a Laís Querino,

Wisley e Illanna Brandão que estiveram comigo diariamente na rotina laboratorial compartilhando dos mesmos sentimentos e desafios que o mestrado nos proporciona.

Não posso esquecer os estagiários do laboratório, sem vocês nada seria da mesma forma, vocês foram peças fundamentais na construção desse trabalho. Obrigado Charles, Eduarda, Henrique, Luana, Manoel, Manú, Tuarne, e Felipe. Sejam muito felizes na vida e na profissão.

Agradeço também a todos os que compõem a Central Monte Verde de Reprodução Equina, por toda ajuda e disponibilidade, sem o apoio de vocês, as coisas certamente ficariam mais difíceis. Obrigado Gilvannya Sobral, Diogo Gutemberg, Oswaldo Gomes Neto e Breno Santana.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado, durante o segundo ano de pesquisa do mesmo, a qual foi de extrema importância para continuidade e desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos os que compõem a UFRPE-UAG, hoje nomeada Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE), a qual foi minha casa de formação e que sempre está de portas abertas para ajudar. Agradeço a todos os que compõem o CENLAG na pessoa de Isabele, Sr. Jair e Sr. Cláudio, obrigado pela dedicação e solicitude em qualquer circunstância

A todos, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 O Ozônio	21
2.1.1 Mecanismos de ação	21
2.2 Ozonioterapia na Medicina Veterinária	23
2.2.1 Ozonioterapia na buiatria.....	24
2.2.2 Ozonioterapia na medicina de cães e gatos.....	25
2.2.3 Ozonioterapia na hipiatria.....	26
2.2.4 Ozônio na Reprodução.....	27
2.3 Óleo de Girassol Ozonizado e suas propriedades terapêuticas	28
2.4 Endometrite: causas e consequências	30
2.5 Resistência e suscetibilidade na endometrite.....	33
2.6 Mecanismos de defesa uterina	34
2.7 Principais patógenos associados à endometrite	36
2.8 Virulência e Resistência microbiana	38
2.9 Biofilme em casos de endometrite	40
2.10 Tratamentos convencionais e não convencionais	42
2.10.1 Lavagem uterina.....	42
2.10.2 Drogas Ecbólicas.....	43
2.10.3 Antibiotecoterapia	43
2.10.4 Antifúngicos	45
2.10.5 Plasma Rico em Plaquetas	47
2.10.6 Células tronco	47
2.10.7 Imunomoduladores.....	48
2.10.8 Ozonioterapia	49
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
4 OBJETIVOS.....	71
4.1 GERAL	71
4.2 ESPECÍFICOS	71
CAPÍTULO I.....	72
CAPÍTULO II	83
APÊNDICES	104
ANEXOS.....	110

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE SENSIBILIDADE/RESISTÊNCIA IN VITRO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS

Figura 1. Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas do útero de éguas suscetíveis localizadas no Agreste de Pernambuco.....82

CAPÍTULO II

EFEITO DO ÓLEO DE GIRASOL OZONIZADO NA QUEBRA DE BIOFILME IN VITRO PRODUZIDO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS.

Figura 1. Frequência absoluta e relativa de microrganismos isolados por cultura microbiológica do útero de éguas da região do Agreste Pernambucano na estação de monta de 2019.....103

Figura 2. Classificação das amostras de bactérias isoladas de útero de éguas suscetíveis quanto sua capacidade de produção de biofilme *in vitro*103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE SENSIBILIDADE/RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa de microrganismos isolados por cultura microbiológica do útero de éguas da região do Agreste Pernambucano na estação de monta de 2019.....82

CAPÍTULO II

EFEITO DO ÓLEO DE GIRASOL OZONIZADO NA QUEBRA DE BIOFILME *IN VITRO* PRODUZIDO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS.

Tabela 1. Suscetibilidade de bactérias isoladas do útero de éguas a diferentes concentrações de óleo de girassol ozonizado.....102

Tabela 2. Ação do Óleo de Girassol Ozonizado sobre o biofilme de bactérias isoladas do útero de éguas suscetíveis.....102

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

® - Marca registrada

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

4-HNE – 4-hidroxinoneal

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina Trifosfato

BHI - Brain Heart Infusion

CCE - Coletores comerciais escovas citológicas

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CTM – Células tronco mesenquimal

D – dia

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade ótica

EGF – Fator de crescimento epidermal

FGF – Fator de crescimento fibroblástico

GSH-Px – Glutathione Peroxidase

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HGF – Fator de crescimento hepatocitário

HSP-70 – Proteína de choque térmico

IA – Inseminação Artificial

IFN-γ – Interferon Gama

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina 1

IL-1 – Interleucina 1

IL10 – Interleucina 10

IL-17A – Interleucina 17A

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

kg – Quilograma

LABRAPE – Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco

LIU – Líquido Intrauterino

LOP – Lipooligopeptídeos

MBC – Minimum Bactericidal Concentration

mcg – Microgramas

meq – Miliequivalente

mg – Miligramas

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

ml – mililitros

MPE – Membro Posterior Esquerdo

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NaCl – Cloreto de Sódio

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NFL – Não Fermentadores de Lactose

nm – Nanômetros

Nrf2 – Fator 2 do eritróide 2

O – Oxigênio atômico

O₂ – Oxigênio molecular

O₃ - Ozônio

ODc – Densidades óticas do controle negativo

ODs – Densidades óticas

ODt – Densidades óticas das amostras testes

OSH – Ovariosalpingoesterectomia

PBP – Proteínas Ligadoras de Penicilinas

PCA - Agar de contagem de placas

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDEGF – Fator de crescimento epidermal derivado das plaquetas

PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

PGF2 α – Prostaglandina F-2 alfa

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIA - Polissacarídeo intercelular adesina

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PS/A - Polissacarídeo capsular/adesina

RJ – Rio de Janeiro

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas do oxegênio

SCA – Capacidade do soro autólogo

SOD – Superóxido Dismutase

SRD – Sem Raça Definida

TE – Transferência de Embriões

TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta

TH1 – Células T Helper 1

TH2 – Células T Helper 2

TNF- α – Interferon Alfa

TSB – Caldo tríplice caseína

UFCs – Unidades formadoras de colônias

UFRPE-UAG – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns

UI – Unidades Internacionais

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

VM - reação de Vermelho de Metila

VP - reação de Voges- Proskauer

μ – Micrômetros

μL – Microlitros

APÊNDICES

Apêndice 1. EFEITOS DA INFUSÃO DE ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS SOBRE A REMOÇÃO DO BIOFILME UTERINO EM ÉGUAS DOADORAS DE EMBRIÕES COM ENDOMETRITES PERSISTENTES.....	104
Apêndice 2. IDENTIFICAÇÃO DE ENDOMETRITE SUBCLÍNICA EM ÉGUAS DOADORAS DE EMBRIÕES.....	109

ANEXOS

Anexo 1. Licença CEUA/UFRPE.....	110
Anexo 2. Ficha de identificação do animal.....	111
Anexo 3. Normas de submissão para a Revista Brasileira de Reprodução Animal.....	113
Anexo 4. Normas de submissão para o Journal “Theriogenology”.....	118

RESUMO

Em éguas com endometrite infecciosa crônica, os microrganismos podem dificultar o diagnóstico e tratamento, levando ao uso indiscriminado de antibióticos, resultando no aumento da resistência antimicrobiana, geralmente associada à formação de biofilme. A ozonioterapia pode ser uma opção terapêutica da endometrite, devido aos seus efeitos bactericidas e antiinflamatórios. O objetivo desse estudo foi realizar a identificação e perfil de sensibilidade/resistência a antimicrobianos, produção de biofilme de bactérias isoladas do útero de éguas e avaliar o efeito do óleo de girassol ozonizado na quebra de biofilme *in vitro*. Amostras de 41 éguas com histórico de subfertilidade foram coletadas. Para cultura bacteriana foram armazenadas em caldo BHI e para cultura fúngica em solução de NaCl a 0,9%, encaminhadas refrigeradas para o LABRAPE-UFRPE. As amostras foram submetidas à cultura e identificação e, posteriormente, ao teste de sensibilidade *in vitro*, e a produção de biofilme foi avaliada pelo método de cristal violeta. Bactérias formadoras de biofilme foram submetidas à ação do óleo de girassol ozonizado, em concentrações pré-determinadas por MIC e MBC. Foi observado isolamento microbiológico em 75,6% (31/41) das amostras. Sendo 25,8% (8/31) *Staphylococcus* spp.; 12,9% (4/31) bacilos Gram-negativos não fermentadores de lactose; 3,22% (1/31) *Streptococcus* β -hemolítico; 3,22% (1/31) *E. coli*; 3,22% (1/31) *Klebsiella* spp. e 3,22% (1/31) *Proteus* spp.; 22,6% (7/31) das amostras apresentaram *Bacillus* spp. e *Micrococcus* spp em 6,45% (2/31). Dentre as amostras isoladas com fungos 6,45% (2/31) foram positivas para *Cladosporium* spp. Observou-se ainda 12,9% (4/31) presença de infecção mista, (*Klebsiella* spp. e *E. coli* - 1/31) (*Staphylococcus* spp. e *Penicillium* spp. 1/31), (*Staphylococcus* spp. e *Cladosporium* spp. – 1/31) e (*Klebsiella* spp. e *Trichosporon* spp. 1/31). Quanto ao perfil de sensibilidade, 95,23% apresentaram sensibilidade para Amicacina; 90,47% para Gentamicina, Enrofloxacin, Tetraciclina e Ceftriaxona e 80,95% para Azitromicina. Em relação ao perfil de resistência, 95,24% das amostras resistentes a penicilina, e 100% das bactérias Gram-negativas resistentes e 70% para Ampicilina. Dos 21 isolados bacterianos submetidos à produção de biofilme 76,2% (16/21) apresentaram produção positiva, sendo 43,75% (7/16) fracas produtoras; 43,75% (7/16) moderadas produtoras e 12,5% (2/16) fortes produtoras, com uma média de massa de biofilme de 0,145 (0,328 $\pm$ 0,066) para os cocos Gram-positivos e 0,155 (0,307 $\pm$ 0,077) para os bacilos Gram-negativos. Após a ação do Óleo de Girassol Ozonizado na concentração de 203,43 mEq/L foi observada redução na massa de biofilme dos bacilos Gram-negativos para 0,109 (0,054 $\pm$ 0,210). Pode-se concluir que a endometrite bacteriana foi mais prevalente nesse estudo, no entanto, alguns casos com presença de desenvolvimento de infecção fúngica concomitante. Os macrolídeos se mostraram efetivos contra os agentes testados e os β -Lactâmicos inviáveis principalmente para endometrites por bactérias Gram-negativas. O Óleo de Girassol Ozonizado apresentou resultados favoráveis para quebra de biofilme de bactérias Gram negativas.

Palavras-chave: Ozônio; Endometrite; Peróxido; Reprodução; Equinos.

ABSTRACT

In mares with chronic infectious endometritis, microorganisms can make diagnosis and treatment difficult, leading to the indiscriminate use of antibiotics, resulting in increased antimicrobial resistance, usually associated with the formation of biofilm. Ozone therapy can be a therapeutic option for endometritis, due to its bactericidal and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to perform the identification and profile of sensitivity / resistance to antimicrobials, biofilm production of bacteria isolated from the uterus of mares and to evaluate the effect of ozonized sunflower oil on the breakdown of biofilm in vitro. Samples from 41 mares with a history of subfertility were collected. For bacterial culture they were stored in BHI broth and for fungal culture in 0.9% NaCl solution, sent refrigerated to LABRAPE-UFRPE. The samples were subjected to culture and identification and, subsequently, to the in vitro sensitivity test, and the biofilm production was evaluated by the violet crystal method. Biofilm-forming bacteria were subjected to the action of ozonated sunflower oil, in concentrations predetermined by MIC and MBC. Microbiological isolation was observed in 75.6% (31/41) of the samples. 25.8% (8/31) *Staphylococcus* spp.; 12.9% (4/31) non-lactose fermenting Gram negative bacilli; 3.22% (1/31) β -hemolytic *streptococcus*; 3.22% (1/31) *E. coli*; 3.22% (1/31) *Klebsiella* spp. and 3.22% (1/31) *Proteus* spp.; 22.6% (7/31) of the samples presented *Bacillus* spp. and *Micrococcus* spp. in 6.45% (2/31). Among the samples isolated with 6.45% (2/31) fungi were positive for *Cladosporium* spp. It was also observed 12.9% (4/31) presence of mixed infection, (*Klebsiella* spp. And *E. coli* - 1/31) (*Staphylococcus* spp. and *Penicilium* spp. 1/31), (*Staphylococcus* spp. and *Cladosporium* spp. - 1/31) and (*Klebsiella* spp. and *Trichosporon* spp. 1/31). As for the sensitivity profile, 95.23% had sensitivity to Amikacin; 90.47% for Gentamicin, Enrofloxacin, Tetracycline and Ceftriaxone and 80.95% for Azithromycin. Regarding the resistance profile, 95.24% of the samples resistant to penicillin, and 100% of gram-negative resistant bacteria and 70% to Ampicillin. Of the 21 bacterial isolates submitted to biofilm production, 76.2% (16/21) showed positive production, with 43.75% (7/16) being poor producers; 43.75% (7/16) moderate producers and 12.5% (2/16) strong producers, with an average biofilm mass of 0.145 (0.328 ± 0.066) for Gram positive coconuts and 0.155 (0.307 ± 0.077) for Gram Negative bacilli. After the action of Ozonized Sunflower Oil at a concentration of 203.43 mEq / L, a reduction in the biofilm mass of Gram negative bacilli was observed to 0.109 (0.054 ± 0.210). It can be concluded that bacterial endometritis was more prevalent in this study, however, some cases with the presence of concomitant fungal infection. Macrolides were effective against the tested agents and β -Lactamics were not viable mainly for Gram-negative bacteria endometritis. Ozonized Sunflower Oil showed favorable results for the breakdown of Gram negative bacteria biofilm.

Keywords: Ozone; Endometritis; Peroxide; Reproduction; Horse.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as enfermidades que acometem o sistema reprodutivo das fêmeas equinas, a endometrite é considerada uma das mais importantes. As alterações causadas no endométrio uterino devido ao processo infeccioso e inflamatório levam à incapacidade de concepção, morte embrionária precoce ou ao encurtamento da fase lútea. Desta forma, exercendo um impacto econômico significativo na produção equina, já que os animais afetados apresentam ciclo estral irregular, requerem manejo intensivo e exigem maior número de ciclos estrais para a obtenção de um produto viável, resultando no incremento dos custos de produção (THOMASSIAN, 2007; DIEL DE AMORIM et al., 2015).

A endometrite apresenta diversas classificações, tais como: endometrite persistente, aguda, crônica, subclínica, de ocorrência pós-parto, decorrente de infecções bacterianas, fúngicas, virais, induzida pela monta, entre outras (HURTGEN, 2006). Na maioria das vezes, a endometrite infecciosa apresenta origem bacteriana (RIDDLE et al., 2007), entretanto, fungos leveduriformes e filamentosos, são potencialmente patogênicos para o endométrio das éguas (GHASEMZADEHNAVA et al., 2004; LeBLANC, 2008). Éguas resistentes são capazes de eliminar bactérias, entretanto éguas consideradas susceptíveis com mecanismo de defesa uterino comprometido podem evoluir para uma infecção crônica (PETERSEN et al., 2015). Em éguas com infecção crônica, os agentes podem se alojar internamente no estrato esponjoso do endométrio formando uma infecção subclínica, dificultando um diagnóstico preciso, assim como um tratamento mais eficaz.

A falha do tratamento com antibióticos resulta em doenças prolongadas levando a complicações, consequentemente mais visitas aos veterinários e perdas econômicas. Tem-se relatado infecções uterinas crônicas em éguas resistentes a antimicrobianos que podem ser causadas pela produção de biofilme, o qual consiste em uma matriz que se adere às micro-colônias, impedindo a penetração do antibiótico. A formação de biofilme no trato reprodutivo equino é teorizada como uma causa significativa de endometrite crônica na égua (VARGAS et al., 2019).

O tratamento intrauterino com Ozônio (O₃) proporciona um ambiente mais favorável para inseminação e fertilização, devido à redução dos efeitos inflamatórios decorrentes da endometrite. O mecanismo de ação deste gás ocorre por meio da redução do quadro

inflamatório, da melhora da perfusão dos tecidos lesados e da ativação do sistema imune com base na produção de citocinas (ZOBEL, 2013).

O O₃ foi descoberto em meados do século XIX, em uma forma triatômica de oxigênio, com uma estrutura dinamicamente instável devido à presença de estados mesoméricos. A palavra “ozônio” deriva do grego “ozein”, que significa olfato, o que faz referência ao seu odor, considerado amargo (SRIKANTH et al., 2013).

A utilização do O₃ como terapia teve início há mais de 150 anos (ELVIS; EKTA, 2011). Quando foi usado pela primeira vez como uma molécula microbicida em 1856 e posteriormente em 1860, para esterilizar salas de cirurgias e sistemas de tratamento de água, respectivamente (MERHI et al., 2019). Durante o século passado vários estudos revelaram outras atividades importantes, como suas funções antioxidantes e antiinflamatórias e seu efeito imunoestimulador. Hoje, os efeitos de terapia com o O₃ estão sendo comprovados. Além disso, estes têm sido consistentes e possuem efeitos colaterais mínimos, possibilitando seu amplo uso (ELVIS; EKTA, 2011).

A reação do ozônio com óleos vegetais tais como o óleo de girassol, ocorre quase exclusivamente com as duplas ligações entre carbonos presentes nos ácidos graxos insaturados (BAILEY, 1978). Essa reação produz vários compostos oxigenados, como hidroperóxidos, ozonetos, aldeídos, peróxidos, diperóxidos e poliperóxidos (LEDEA, 2003). Esses compostos oxigenados, também podem ser responsáveis pela ampla atividade biológica dos óleos vegetais ozonizados. O rendimento dos compostos oxigenados a partir de óleos insaturados depende das condições e de reações necessárias, como o tipo de meio em que a reação ocorre, a presença de aditivos, a temperatura da reação, o tipo de reator, a agitação da mistura de reação e as doses de ozônio aplicadas (LEDEA, 2003).

Assim, levando em consideração que o Brasil possui destaque no cenário mundial como um dos principais investidores em tecnologias capazes de melhorar a eficiência reprodutiva dos equinos em busca de incrementos na produção e a necessidade de se buscar novas formas de terapias econômicas e seguras para tratar a endometrite, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência do óleo de girassol ozonizado na quebra de biofilme produzido *in vitro* por bactérias isoladas do útero de éguas susceptíveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Ozônio

O gás ozônio foi descoberto em 1840 pelo químico alemão, Friedrich Christian Schönbein, quando observou o surgimento de um gás de coloração azulada e odor característico após a liberação de descargas elétricas em uma campânula de vidro contendo oxigênio, denominando-o ozônio (BOCCI, 2011).

O O_3 é um componente natural da atmosfera, no entanto, sua distribuição varia entre as atmosferas superior e inferior (estratosfera e troposfera, respectivamente). Na estratosfera, o O_3 forma uma camada essencial para a filtração da radiação ultravioleta e é gerada pela combinação química de oxigênio atômico (O) com oxigênio molecular (O_2) (HÄNNINEN, 2019). O processo de formação de O_3 está em equilíbrio dinâmico com sua destruição natural, causada por diferentes reações, incluindo a colisão com radiações ultravioleta e infravermelha (MUSTAFA, 1990). Já na troposfera, o O_3 é considerado um poluente obtido da reação entre óxidos de nitrogênio (liberados de fontes como escapamento de automóveis, emissões de usinas e incêndios florestais) e luz solar (LANGE et al., 2018).

Apesar de seu papel como poluente, o O_3 é usado na medicina humana e veterinária. O uso médico de uma mistura gasosa de O_3/O_2 , chamada de ozonioterapia, baseia-se no pressuposto de que o O_3 se dissocia rapidamente na água e libera uma forma reativa de oxigênio que pode oxidar as células (CASE et al., 2012). Essa dissociação aumenta a disponibilidade de oxigênio e ATP para a atividade celular (BHATT et al., 2016). O O_3 pode ser considerado um pró-medicamento, pois pode induzir a ativação de um segundo mensageiro em cascata com múltiplas ações sistêmicas e consequente rearranjo das vias bioquímicas (RE et al., 2008).

2.1.1 Mecanismos de ação

Dependendo de sua concentração o O_3 pode reagir com todas as macromoléculas das membranas celulares, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos, DNA e RNA (BOCCI, 2006; CLAVO et al., 2019). Porém, devido as suas propriedades oxidantes, sua ação ocorre predominantemente com as duplas ligações entre as moléculas de carbono, presente nos ácidos graxos poliinsaturados, gerando espécies reativas do oxigênio (ROS) e os produtos de oxidação dos lipídeos, chamados de

lipooligopeptídeos (LOP), dentre eles o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o 4-Hidroxinoneal (4-HNE), respectivamente (BOCCI et al., 2009; BOCCI et al., 2011; VIEBAHN-HANSLER et al., 2012; CLAVO et al., 2019). Enquanto ROS agem imediatamente e desaparecem, LOP's são distribuídos para os tecidos via circulação e algumas moléculas se encaixam nos receptores das células. Por ordem de preferência, O_3 reage primeiro com ácidos graxos poliinsaturados, antioxidantes como ácido ascórbico e úrico e componentes tiólicos como cisteína e albumina e posteriormente com carboidratos, enzimas, DNA e RNA (BOCCI, 2006).

Uma particularidade do principal ROS, o H_2O_2 , é que ele se difunde facilmente pelo plasma e entra nas células, sendo que, em cada célula, ele causa um efeito bioquímico diferente. De modo geral, ao interagir com a membrana celular e com citoplasma, o H_2O_2 estimula a via do fator nuclear relacionado ao fator 2 do eritroide 2 (Nrf2), o que favorece a síntese de proteínas, que são essenciais para a sobrevivência celular (RE et al., 2014; GALIE et al., 2018; SINISCALCO et al., 2018; WANG et al., 2018).

Já a degradação do LOP, 4-HNE envia um sinal rápido de estresse oxidativo transitório, através da produção de vários radicais livres, tais como, lipoperóxidos, lipohidroperóxidos e isoprostanose aldeídos, os quais são potencialmente tóxicos e acabam ativando a síntese de várias substâncias como a γ -glutamil transpeptidase (uma enzima glicosilada que catalisa a transferência da fração γ -glutamil dos doadores de peptídeos para diferentes receptores, incluindo aminoácidos, dipeptídeos e H_2O), proteína de choque térmico (HSP-70, uma proteína induzida pela resposta fisiológica das células ao estresse), a heme-oxigenase-1 (uma resposta generalizada ao estresse oxidativo) e enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e a via Nrf2. Esse mecanismo é a base de um fenômeno considerado paradoxal, onde uma molécula oxidante como o ozônio, desencadeia uma potente ação antioxidante (CLAVO et al., 2019).

As enzimas anti-radicaais livres agem principalmente inibindo a formação do radical H_2O_2 e de seus precursores. Este radical implica na destruição de componentes celulares, incluindo DNA, lipídeos e proteínas. O sistema enzimático inibidor de radicais livres, provavelmente está ligado ao nível de oxigenação de NADH, uma vez que o gás estimula o fluxo de O_2 na membrana e promove a utilização do O_2 na cadeia respiratória mais efetiva da mitocôndria (MADEJ et al., 2007). Isso implica em

aumento de ATP, que leva ao aumento do metabolismo celular (BECK, 1998). Em outras palavras, assim que misturado ao sangue, o O₃ desaparece, ROS e LOP's são formados e desencadeiam o processo terapêutico (BOCCI, 2007; HADDAD, 2009).

Quanto ao efeito antimicrobiano, supõe-se que o ataque primário do O₃ se dê sobre a parede celular da bactéria, e depois, ao penetrar no interior da célula, este agente promove a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucleicos (OGATA; NAGAHATA 2000; RIFA; MUSA 2005). Os microrganismos não possuem um sistema contra radicais livres evoluído como os mamíferos (VIGLINO, 2008), sendo que a lise celular depende da extensão destas reações (VELANO et al., 2001).

Segundo Zang et al. (2016) a ação do O₃ sobre os microrganismos ocorre através da reação do mesmo na parede celular bacteriana com os aminoácidos, compostos aromatizados ativados e resíduos de enxofre, E com as ligações insaturadas dos fosfolipídios, proteínas, peptídoglicanos e lipossacarídeos na superfície celular bacteriana. Assim, depois que a membrana é danificada pelo processo de oxidação, há um aumento na sua permeabilidade e conseqüentemente uma maior penetração do gás e seus subprodutos para o interior das células.

Estudos realizados por Stange et al. (2019) demonstraram que concentrações baixas de O₃ (1 mg/L) foram eficientes na destruição de mais de 99% de bactérias previamente avaliadas pela presença de genes de resistência à antimicrobianos e resistentes *in vitro*.

Contra fungos, o O₃ atua através do mesmo mecanismo oxidativo usado nas membranas celulares, podendo ser usado em sua forma gasosa ou em associação com óleos vegetais, com resultados relevantes em infecções causadas por três tipos de dermatófitos comuns, os *Epidermophyton* spp.; *Microsporum* spp. e *Tricophyton* spp. apresentando potencial efeito fungicida e inibitório de esporulação. Além disso, age reduzindo a síntese de enzimas essenciais para as interações entre comunidades fúngicas e dos fungos com seus hospedeiros que são fatores de virulência e de multiplicação essenciais (OUF, et al., 2016).

2.2 Ozonioterapia na Medicina Veterinária

O ozônio medicinal é obtido através de um equipamento gerador de ozônio, onde o oxigênio conectado através de um cilindro com o gás acoplado ao aparelho sofre descargas elétricas, transformando-se em duas moléculas de oxigênio atômico,

que se unem novamente a mais uma molécula de oxigênio, originando o O₃. A utilização do gás ozônio como método terapêutico é justificado por suas propriedades viricida, fungicida e bactericida, baseado no seu mecanismo de ação resultante da oxidação da membrana celular e componentes citoplasmáticos, causando a morte dos microrganismos. Nenhuma outra substância se mostra capaz de combater e eliminar patógenos como o gás ozônio (CARDOSO, 2009). O O₃ também apresenta alta capacidade de penetração tecidual melhorando a circulação e a oxigenação, reduz a agregação plaquetária, atua como agente antiálgico e favorece as respostas imunológicas através do sistema reticuloendotelial (MATOS NETO et al., 2012).

De maneira geral, o ozônio médico é indicado para o tratamento de patologias de origem inflamatória, infecciosa e isquêmica. Por exemplo: feridas infectadas, inflamadas, mal curadas e de processos inflamatórios crônicos, tais como úlceras, colites e outras inflamações intestinais; problemas circulatórios; doenças causadas por vírus tais como hepatite e herpes; além de ser utilizada como terapia complementar em vários tipos de câncer e outras enfermidades. O gás também pode servir como ativador imunológico quando administrado em vias específicas. (BOCCI, 2011).

As vias de administração para o uso do ozônio medicinal são variadas (BORGES et al, 2019) e a seleção da via mais adequada deve ter em conta a patologia, o seu estágio e, igualmente, a condição do paciente. Segundo a Declaração de Madrid de 2020, as principais vias de administração do ozônio são através de auto-hemoterapia maior e menor, insuflação retal, subcutânea e intralesional e através de solução salina ozonizada, devendo sempre ser levada em consideração a dose correta, de acordo com a via de administração e o peso do animal. Não devendo ser usada, assim como na medicina humana, por via inalatória.

2.2.1 Ozonioterapia na buiatria

O uso terapêutico do O₃ na buiatria tem se mostrado com bastante eficiência em diferentes enfermidades (SCIORSI, et al. 2020). Trabalhos realizados por Moreira et al. (2014), ao avaliarem a ação do ozônio administrado por via intramamária em vacas com mastite subclínica, observaram uma redução considerável no número de *Corinobacterium bovis* 24 e 48 horas após o uso da ozonioterapia, quando comparado ao grupo controle. Enginler et al. (2015) ao avaliarem o efeito de diferentes concentrações de ozônio no tratamento de mastite clínica associada com

antibioticoterapia, observaram que as vacas que foram tratadas com concentrações de O₃ acima dos 70% em associação com antibióticos sistêmicos, se mostraram mais eficientes na redução de células somáticas e eliminação de patógenos.

Cáfarro Filho et al. (2014) também observaram eficiência no tratamento de mastite subclínica causada por *Prototheca* sp. em uma ovelha, através do uso de 180 ml de ozônio intramamário, não sendo mais observada a presença desta bactéria nas amostras de leite subsequentes ao uso da ozonioterapia.

Kovacs et al. (2013) também relatam resultados positivos com o uso da ozonioterapia como coadjuvante no tratamento de intoxicação por ivermectina em uma bezerra de 7 meses, onde no protocolo foi realizado com administração com água ozonizada por via oral e água destilada ozonizada por via endovenosa na concentração de 18mg/L havendo melhora nos parâmetros físicos e bioquímicos do paciente com 7 dias após o início do protocolo com O₃.

Szponder et al. (2017) também avaliaram a associação terapêutica do O₃ na concentração de 70mg/ml com o plasma rico em plaquetas (PRP) em ovelhas com pododermatite séptica, enfermidade mais conhecida como podridão dos cascos, utilizando aplicação dessa associação por 20 minutos três vezes por semana, havendo recuperação de 100% das ovelhas tratadas .

2.2.2 Ozonioterapia na medicina de cães e gatos

Alguns trabalhos apresentam resultados satisfatórios com o uso de O₃ na dermatologia de animais de companhia, Borges et al. (2019) relataram resultados eficientes ao tratar cães da raça Golden Retriever com Dermatite Bacteriana crônica, com a utilização de ozônio de forma tópica e sistêmica, através de bagging e insuflação retal, respectivamente. Ignácio e Montechiesl (2018) também apresentaram resultados satisfatórios ao relatarem um caso de um cão de raça Dogo Argentino de 4 anos de idade que apresentava uma dermatite psicogênica crônica tratada anteriormente com corticoide sistêmico e pomadas à base de antibióticos e antiinflamatórios, mas sem sucesso, porém com o uso tópico de bagging de ozônio na concentração de 41µg /ml por 15 minutos e óleo ozonizado associado com a aplicação sistêmica de ozônio através de insuflação retal na concentração 18 µg /ml houve resolução de 50% da lesão após 6 semanas de tratamento.

Kosachenco et al. (2016) também relatam sucesso com a ozonioterapia em um felino SRD de um ano e meio de idade, positivo para Esporotricose, que estava em tratamento convencional à base de Itraconazol há 6 meses sem sucesso evidente, porém apresentou cicatrização total das lesões após 45 dias de tratamento com insuflação transretal de ozônio, *bagging* e utilização tópica de óleo de girassol ozonizado.

Trald (2019) ao avaliar o efeito da ozonioterapia como terapia complementar em casos de Parvovirose canina em 25 cães PCR positivos para doença, comparando dois grupos de pacientes em que o primeiro grupo recebeu tratamento sintomático convencional para a enfermidade e o segundo grupo recebeu o tratamento convencional associado a insuflação retal de O₃ na concentração de 15 µg/ml, concluiu que o grupo controle apresentou 20 vezes mais chance de vir a óbito quando comparado ao grupo que foi tratado com o O₃.

Teixeira et al. (2013) avaliando os efeitos do ozônio por insuflação retal ou em pontos de acupuntura em cadelas submetidas à OSH em comparação com a terapia convencional antiinflamatória à base de antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais, observaram que não houve diferenças estatísticas significativas nas escalas de dor utilizadas entre os protocolos analgésicos avaliados, sendo o O₃ uma opção alternativa para promover o alívio da dor em cadelas submetidas à OSH.

2.2.3 Ozonioterapia na hipiatria

A utilização da ozonioterapia é secular, porém não existem estudos expressivos de sua utilização na medicina equina. Jaramillo et al. (2020) ao avaliarem os aspectos clínicos e laboratoriais da aplicação de ozônio medicinal através de insuflação retal, observaram que os animais não apresentaram alterações clínicas evidentes após a aplicação de 1 litro o O₃ por via transretal na concentração de 10, 15 e 20 µg / ml, porém foi observado uma maior concentração de hemácias nos exames laboratoriais dos animais pós aplicação.

Garcia et al. (2008), demonstraram que o uso do tratamento tópico com água e azeite ozonizados em associação com a insuflação retal de O₃, foi eficaz no tratamento da Habronemose cutânea de um equino de 15 anos de idade. Reis et. al. (2018) também apresentaram resultados eficientes ao utilizar o O₃ topicamente através de *bagging* e soluções ozonizadas, no tratamento de Pitiose em uma égua de 9 anos de idade. Porém, o uso contínuo e por longos períodos de tempo desta terapia, no tratamento de feridas,

pode levar a um aumento das respostas teciduais proliferativas, adaptativas e pró-inflamatórias nos tecidos cutâneos, o que pode trazer sérios malefícios no processo de cicatrização dessas lesões (FITZPATRICK et al. 2018).

A terapia com o O₃ também vem sendo estudada na ortopedia equina, Vendruscolo et al. (2017) ao avaliarem os efeitos inflamatórios e oxidantes do ozônio nas articulações sinoviais de equinos hígidos, através da avaliação de biomarcadores inflamatórios e de catabolismo da cartilagem articular, verificaram que não houve diferença estatística entre esses biomarcadores indicando a ozonioterapia como uma prática segura a ser utilizada em articulações sinoviais de equinos.

Coelho et al. (2015) também relataram o uso da ozonioterapia em uma égua de 10 anos de idade, com diagnóstico de Laminite Crônica, com rotação de terceira falange e perfuração de sola do membro posterior esquerdo (MPE), o tratamento instituído foi com o uso de ozônio intramuscular, peritendinoso e insuflação retal, além de casqueamento corretivo, o animal após teve alta após 6 meses com redução no grau de claudicação e relação normal de angulação da terceira falange com o estojo córneo.

Alves et al. (2004) ao avaliarem a influência da ozonioterapia como tratamento para casos de lesões por reperfusão em jejuno de equinos, observaram que os parâmetros histopatológicos de mucosa e submucosa, apresentaram-se atenuados após a aplicação de ozônio na concentração de 50 µg / ml sobre a lesão, o que está relacionado, segundo os autores, a capacidade de modulação das enzimas antioxidantes que o ozônio apresenta que interferiram nas etapas bioquímicas das lesões de reperfusão, tornando-se uma alternativa para o tratamento de pacientes com Síndrome Cólica que apresentem lesões de reperfusão.

2.2.4 Ozônio na Reprodução

Dentre as várias terapias existentes para o tratamento para os distúrbios reprodutivos para as fêmeas de animais domésticos (bovinos, ovinos e equinos) assim como para as mulheres, a ozonioterapia vem se apresentando como uma possibilidade de tratamento com resultados animadores, principalmente em casos de endometrite na medicina veterinária (DURICIC et al. 2015).

Em um trabalho de revisão realizado por Merhi et al. (2019) ao realizarem levantamento bibliográfico sobre a ação do ozônio em algumas patologias do sistema reprodutivo feminino, observaram através dos dados compilados que o O₃ pode ter um

efeito benéfico nas alterações de oclusão tubária, assim como na prevenção e tratamento de endometrites e vaginites, proteção dos ovários contra a isquemia e a perda de ovócitos, como também diminuir a formação de aderências pélvicas.

Djuricic et al. (2012) ao avaliarem o efeito da aplicação preventiva de ozônio em vacas holandesas no puerpério imediato e correlacionar esses dados com a eficiência reprodutiva das mesmas, observaram que as vacas que foram submetidas a aplicação de espuma de ozônio intrauterino por 5 segundos apresentaram melhor taxa de prenhez no primeiro cio e melhores taxas de concepção nos cios subsequentes, o que implica em dizer que apresentaram uma melhor eficiência reprodutiva comparada aos outros dois grupos estudados, o grupo controle e ao grupo de vacas que receberam pérolas do ozônio intrauterinas ao invés da espuma.

Além de prevenir as alterações do sistema reprodutivo e melhorar as taxas de concepção, a ozonioterapia também vem sendo utilizada no tratamento de diversas patologias reprodutivas. Trabalhos realizados por Zobel et al. (2012) ao avaliarem a eficiência de tratamentos conservativos em relação a urovagina em vacas leiteiras e suas consequências na vida reprodutiva destas, observaram que as vacas que foram tratadas com ozônio, apresentaram melhores taxas de concepção, encurtamento do período seco e menor taxa de abate, quando comparado ao grupo de vacas tratadas com solução salina e daquelas tratadas com estreptomicina intrauterino.

Além da urovagina, a ozonioterapia também se mostra como um potencial tratamento para os casos de retenção de placenta em vacas (ZOBEL; TKALCIC 2013), metrite e endometrites tanto em vacas como em equinos (ALVAREZ, 2013; MONTECHIESI; IGNÁCIO, 2018). O ozônio pode ser considerado um importante agente antimicrobiano, capaz de ser um potencial agente terapêutico alternativo para os casos de endometrite. Polat et al (2015) ao compararem o efeito do tratamento com ozônio intrauterino com a aplicação de rifaximina em vacas com endometrite subclínica diagnosticada através de ultrassonografia, observaram que não houve diferença significativa entre os grupos testados no que diz respeito ao intervalo entre o período de tratamento e a prenhes. O intervalo de parto à prenhes e o número de inseminações até a concepção, o que segundo o autor, demonstra que a ozonioterapia é uma importante alternativa em casos de endometrite subclínica na espécie bovina.

2.3 Óleo de Girassol Ozonizado e suas propriedades terapêuticas

O Girassol é uma planta da família *Compositae*, nativa da América do Norte, e até o século XVII, foi cultivado como planta ornamental e medicinal. Atualmente o Girassol é cultivado em todos os continentes, em áreas que atingem aproximadamente 18 milhões de hectares. Nos últimos anos, a produção mundial de sementes de girassol aumentou significativamente em comparação a outras culturas produtoras de óleo (CORREIA, 2014).

O Girassol destaca-se como a quarta oleaginosa em produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo. No Brasil, a produção de girassol e o consumo de óleo vêm crescendo nos últimos anos, por ser uma cultura que apresenta características desejáveis sob o ponto de vista agrônomo como o ciclo, a elevada qualidade e rendimento em óleo, que fazem dela uma boa opção aos produtores brasileiros, além de se adaptar a diferentes condições climáticas e o seu cultivo poder ser realizado durante o ano todo. Na extração mecânica obtém-se o óleo como produto principal e a torta como subproduto (LEITE et al. 2007; FERRARI & SOUZA 2009; CORREIA, 2014).

O óleo de girassol possui excelentes características físico-químicas e nutricionais. Possui uma alta relação entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados (65.3%/11,6% em média), sendo que o teor de poli-insaturados é constituído, em sua quase totalidade, pelo ácido linoleico (65% em média). Este é essencial para o desempenho das funções fisiológicas do organismo e deve ser ingerido através dos alimentos, já que não é sintetizado pelo organismo. Por essas características, é um dos óleos vegetais de melhor qualidade nutricional e organoléptica do mundo (CORREIA, 2014).

Essa grande abundância de ácido linoleico em sua composição torna o óleo de girassol um composto importante na reversão de feridas na pele e dermatoses cutâneas. É o precursor de vários ácidos graxos, dentre eles o ácido aracdônico, e indiretamente, das prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos, importantes mediadores inflamatórios e essenciais no processo de cicatrização das feridas, essencial na regulação dos eventos bioquímicos que precedem a fibroplasia além de estimular os fatores de crescimento e neovascularização, causando um aumento considerável da migração de leucócitos e macrófagos. Além disso, essa substância regula processos que precedem a mitose de células fibroblásticas. A vitamina E (tocoferol) também presente do óleo de girassol, atua como antioxidante e protege a membrana celular da ação de radicais livres, podendo minimizar as lesões de reperfusão. De um modo geral, o processo de cicatrização é devido a um mecanismo competitivo entre a síntese e a lise

de colágeno. Assim é que, qualquer fator que aumente a lise ou faça diminuir a síntese do colágeno pode concorrer para a alteração da cicatrização (SATURNO et al. 2016).

Durante o processo de ozonização a reação do O₃ com os óleos vegetais ocorrem quase que exclusivamente com as duplas ligações entre os carbonos presentes nos ácidos graxos insaturados. A ozonização dos ácidos graxos insaturados promove a formação do composto 1,2,3-trioxolano, o qual se decompõe rapidamente para um composto carbônico e um aldeído. Essas duas espécies se recombinaem para fornecer ozonetos, hidroxidroperóxidos, peróxido de hidrogênio e aldeído. Em estudos, foi sugerido que os compostos peróxidos em conjunto com os ozonetos estão envolvidos nos efeitos biológicos dos óleos vegetais ozonizados (SCHWARTZ et al. 2011).

Portanto, os óleos vegetais ozonizados são utilizados para várias aplicações clínicas, tais como na dermatologia, oftalmologia e reprodução (SERIO et al. 2017). Na dermatologia, vários estudos comprovam a ação do óleo de girassol ozonizado em diferentes enfermidades tais como Habronemose (GARCIA et al. 2008), Pitiose (PINTO et al. 2018), Dermatite Bacteriana (BORGES et al. 2019) e em feridas crônicas (FITZPATRICK et al. 2017).

Na oftalmologia, alguns estudos demonstram que os óleos ozonizados podem ser usados para promover a cicatrização de úlceras e tratar outros distúrbios oculares comuns, Spadea et al. (2018) relataram o uso de óleo ozonizado para tratar um cavalo com conjuntivite resistente ao tratamento com antibiótico e anti-inflamatórios convencionais (Tobramicina e Piroxicam associado com Flunixin Meglumine, respectivamente), demonstrando que o óleo apresentou efeito anti-inflamatório, bactericida, cicatrizante que foi primordial para recuperação do paciente.

Na reprodução, Vargas et al. (2019) ao avaliarem o efeito da aplicação intra-uterina de óleo de girassol ozonizado, na remoção de biofilme uterino, de éguas doadoras de embriões consideradas susceptíveis, observaram que 100% dos animais submetidos ao protocolo com óleo ozonizado apresentaram lavados sem turbidez após infusão do óleo, destas 91,6% foram positivas na coleta de embrião ou apresentaram gestação positiva, após o tratamento.

2.4 Endometrite: causas e consequências

Dentre as enfermidades que acometem o sistema reprodutivo das fêmeas equinas, a endometrite é considerada uma das mais importantes, ocorrendo em 25 a 60% das éguas consideradas subférteis (TROEDSSON, 1999; CAUSEY et al., 2006; LEBLANC et al.,

2007; OVERBECK et al., 2011; WOODWARD et al, 2012; KOZDROWSKI et al, 2015). A endometrite pode ser definida como um processo inflamatório local, atingindo principalmente as camadas mais superficiais do útero em resposta a agentes estranhos como plasma seminal, espermatozoides, proteínas e bactérias presentes no sêmen. Geralmente ocorre durante a monta natural, inseminação artificial ou infecções bacterianas e/ou fúngicas oportunistas (MARTH et al., 2015).

As alterações causadas no endométrio uterino devido ao processo infeccioso e inflamatório levam à incapacidade de concepção, morte embrionária precoce e encurtamento da fase lútea, exercendo impacto econômico significativo, já que os animais afetados apresentam ciclo estral irregular, requerem manejo intensivo e exigem maior número de ciclos estrais para a obtenção de um produto viável, resultando no incremento dos custos de produção (THOMASSIAN, 2007; DIEL DE AMORIM et al., 2015).

A característica anatômica do trato reprodutivo da égua favorece a infecção uterina, visto que nessa espécie, os espermatozoides são depositados diretamente no interior do útero, e nesses casos, a infecção pós-cobertura e inflamação são transitórias, tendo em vista que a mesma é determinada mais pela presença dos espermatozoides do que por microrganismos propriamente ditos. Dessa forma, os mecanismos de defesas naturais tornam-se essenciais para eliminação e neutralização dos agentes contaminantes, sendo de suma importância, salientar a necessidade da integridade das barreiras anatômicas, pois patologias como pneumovagina, acúmulo de urina e alteração cervical, convertem-se em fatores predisponentes para endometrite (TROEDSSON, 2011).

O significativo aumento da utilização das biotécnicas da reprodução, como por exemplo, a transferência de embriões (TE) pode ser também um fator desencadeador de endometrites. Na evolução da espécie as éguas tinham seu sistema de defesa uterino, físico, mecânico e celular, geralmente desafiado por uma, duas e raramente três vezes ao ano. Na natureza, a grande maioria das éguas se tornava gestantes já na primeira padreação, ato no qual seu sistema de defesa uterino é desafiado não só pelo sêmen, mas também por sujidades que são carregadas durante o coito. Nos programas de TE, não raramente o útero de éguas doadoras recebem sêmen a cada 20-22 dias. E, em muitos casos, são 9 inseminações por estação de monta. Nestes programas, portanto, os úteros de éguas doadoras são desafiados por um número de vezes bem superior ao que as éguas tiveram no seu padrão evolutivo. E esta pode ser uma das razões pela qual éguas

doadoras de embriões apresentam altos índices de endometrites inflamatórias pré e pós-cobertura (Vargas, 2019. Horses Vet. Services. Informação Pessoal).

A endometrite pode apresentar diversas classificações, de acordo com sua causa, tais como: endometrite persistente pós-cobertura; endometrite crônica; endometrite subclínica; piometra; metrite aguda pós-parto; e endometrite venérea (KATILA, 2016). Na maioria das vezes, a endometrite infecciosa apresenta origem bacteriana, sendo as bactérias *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, mais identificadas nas culturas microbiológicas (RIDDLE et al., 2007; TROEDSSON, 2011). Todavia, fungos leveduriformes e filamentosos, são potencialmente patogênicos para o endométrio das éguas (GHASEMZADEHNAVA et al, 2004; LeBLANC, 2008). Segundo Silva e Alvarenga (2011), *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. são os microrganismos mais comumente isolados de fêmeas equinas com endometrite fúngica.

Os sintomas clínicos mais observados na endometrite são a presença de líquido intrauterino (LIU), edema endometrial excessivo ou com padrão incomum ao ultrassom, encurtamento do ciclo estral, vaginite, cervicite, exsudato mucopurulento vulvar e perda embrionária precoce (DIEL DE AMORIM et al., 2015). Na endometrite subclínica, a égua, não apresenta alterações evidentes ao exame físico, o que necessita de prudência para realização do diagnóstico dessa enfermidade através da utilização de exames complementares, visto que alterações hormonais, anatômicas e nutricionais, também são causas para infertilidade na espécie.

O uso de múltiplos achados durante o exame ginecológico torna-se a forma mais eficiente de diagnosticar esta enfermidade (FERRIS et al., 2016; AMORIM et al., 2016). O exame ginecológico completo consiste na avaliação física do animal, levando em consideração a idade, escore corporal, inspeção perineal, histórico reprodutivo, e exames complementares, tais como, palpação retal, avaliação ultrassonográfica, citologia, cultura, biópsia uterina e vaginoscopia. A maioria dos casos de éguas problemas podem ser diagnosticados através de um exame ginecológico acurado, que facilite a tomada de decisão do profissional quanto à escolha do tratamento mais eficaz, a fim de maximizar a fertilidade (SOARES, 2017).

Há uma constante variação nas espécies de bactérias isoladas, assim como na susceptibilidade aos antibióticos que podem variar de uma população para outra. Uma antibioticoterapia inadequada pode resultar em falhas no tratamento e consequentemente perdas econômicas (PYORALA et. al., 2014). Pode levar ainda a

uma resistência antimicrobiana, fator de preocupação mundial. Embora não se conheça exatamente o mecanismo, o uso repetitivo, prolongado e excessivo de antimicrobianos aparentemente está associado ao aumento da incidência de endometrites fúngicas (LIU, 2011). Segundo Coutinho da Silva & Alvarenga (2011), o refluxo de antibióticos e desinfetantes usados repetidas vezes em tratamentos uterinos podem levar a uma alteração da flora vaginal e criar um ambiente propício para o desenvolvimento de agentes patogênicos tais como fungos e leveduras.

A endometrite quando mal diagnosticada e tratada de forma incorreta pode evoluir para endometrose, a qual é uma alteração degenerativa recorrente em éguas mais velhas ou após inflamações repetidas do útero. A fibrose degenerativa, característica da endometrose, pode ser o resultado de processos normais de envelhecimento, de multiparidade ou pode ser o produto de uma vida de reinfecção contínua. De qualquer maneira, a cura da mucosa uterina causa áreas de fibrose no útero, principalmente em éguas mais velhas (WOODWARD; TROEDSSON, 2015).

Éguas com estruturas reprodutivas fracas podem apresentar retenção urinária, uma condição na qual há uma incapacidade no esvaziamento completo da urina, especialmente durante o estro. Assim, o líquido retido pode causar inflamação e impedir a concepção. Nesses casos, o uso de antibióticos nem sempre é boa opção e uma de suas desvantagens é o fato de eliminar tanto bactérias benéficas, quanto as patogênicas, deixando o animal sem proteção natural contra futuras proliferações de microrganismos oportunistas (LeBLANC, 2011).

2.5 Resistência e suscetibilidade na endometrite

As éguas podem ser divididas em dois grupos suscetíveis e resistentes, de acordo com a sua predisposição ao desenvolvimento de endometrite. As éguas suscetíveis são aquelas que têm propensão para desenvolver endometrite persistente, especialmente devido à dificuldade na eliminação de produtos da inflamação e detritos, após o parto ou cobrição. As éguas resistentes são aquelas que não têm tendência para desenvolver uma infecção uterina, pois conseguem executar uma rápida e eficaz depuração do útero (LEBLANC & CAUSEY, 2009).

Woodward et al. (2013), ao avaliarem as diferenças relacionadas às respostas imunológicas entre éguas resistentes e suscetíveis, demonstraram que as éguas resistentes apresentaram maior expressão de mRNA para IL-6, IL-1 e IL-10, enquanto

que éguas suscetíveis apresentaram um aumento significativo no número de neutrófilos. Este fato pode ser justificado devido a capacidade que as éguas suscetíveis possuem em expressar com maior quantidade mRNA endometrial para citocinas pró-inflamatórias e menor nível de citocinas anti-inflamatórias, o que favorece um elevado número de células em seu endométrio quando comparado às éguas resistentes (FUMUSO et al., 2007).

Além disso, de um modo geral, éguas suscetíveis podem apresentar outras características, tais como, idade avançada e consequentemente lesões degenerativas, tanto do endométrio uterino quanto dos vasos sanguíneos e linfáticos, o que pode dificultar a atividade dos hormônios circulantes, alterar o aporte de células à luz do útero e dificultar a drenagem linfática. Outra característica é que a maioria dessas éguas apresentam deficiência no fechamento vulvar, assim como mau posicionamento do útero, sendo este projetado para o interior da cavidade abdominal, apresentando uma angulação maior e um nível mais baixo em relação ao assoalho da pelve, se comparado com o de éguas jovens e sadias, o que dificulta a drenagem do conteúdo uterino (MALSCHITZKY et al., 2007).

O acúmulo de líquido no útero é um dos sinais mais frequentes em uma égua suscetível. Acúmulos de fluido uterino durante o período ovulatório são consistentemente associados à diminuição das taxas de prenhez (CAUSEY, 2006). Assim, a identificação do líquido antes da cobertura, além de servir como critério para seleção das éguas a serem examinadas 12 horas após a cobertura, pode ser utilizado para selecionar aquelas que devem ser submetidas a tratamentos (MALSCHITZKY, 2007).

Estudos realizados por Reghini et al. (2014), ao avaliarem a resposta inflamatória uterina após a inseminação artificial em éguas suscetíveis e resistentes, concluíram que houve uma resposta inflamatória mais intensa nas éguas suscetíveis quando comparadas às resistentes, pelo aumento do acúmulo de fluido uterino verificado no exame ultrassonográfico, aumento do número de células polimorfonucleares observadas na citologia esfoliativa endometrial e pelo aumento da concentração destas células no líquido intrauterino.

2.6 Mecanismos de defesa uterina

A inflamação uterina em resposta à presença de sêmen e/ou microrganismos é uma reação fisiológica que auxilia na expulsão de sujidades no útero (KOTILAINEN et

al., 1994). Esta reação é imediata e ocorre através de um aporte de neutrófilos, que migram para a mucosa uterina e podem ser identificados com cerca de 30 minutos após a cobertura (KOTILAINEN, et al., 1994), atingindo o pico inflamatório em aproximadamente 12 horas (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1999). Em um útero saudável, o processo inflamatório apresenta uma redução em até 48 horas (TROEDSSON; WOODWARD, 2016).

Normalmente, as éguas dispõem de mecanismos de defesa físicos, mecânicos e celulares do trato reprodutivo, capazes de eliminar os microrganismos e produtos inflamatórios causadores de endometrite. No entanto, qualquer transposição destas barreiras naturais irá predispor a uma infecção uterina (FERRIS, 2016).

A vulva, o esfíncter vestibulo-vaginal e a cérvix representam três barreiras físicas dos órgãos reprodutivos da égua para prevenir infecções uterinas. Se uma dessas barreiras não é funcional, a égua estará propensa a pneumovagina, podendo levar a aspiração de bactérias e irritação do útero (CANISSO et al., 2016). A depuração uterina a partir das contrações miométriais, o relaxamento da cérvix e a drenagem linfática, são considerados formas de defesa mecânicas (LEBLANC, 2011). Ainda existem as respostas celulares via sistema imunológico, com a mobilização de células de defesa (TROEDSSON, 1999; FERRIS, 2016).

A resposta inflamatória no endométrio ocorre rapidamente após a cobertura ou à entrada de patógenos no lúmen uterino, resultando na migração de neutrófilos para o interior do útero e do líquido intrauterino, o qual contém acúmulos de mediadores inflamatórios (TROEDSSON et al., 1992). O influxo de polimorfonucleares é rápido e a duração de infiltração é relativamente curta, assegurando a remoção dos agentes externos, com subsequente retorno do endométrio a um estado de normalidade, preparando-o para receber o embrião (KATILA, 2012).

Por outro lado éguas suscetíveis apresentam falhas nos componentes de defesa uterina garantam uma eliminação local rápida e eficaz da inflamação no útero das éguas com resistência natural (TROEDSSON, 2006). Este fato é considerado o desencadeador de todo processo fisiopatogênico da endometrite, tendo em vista que, as éguas suscetíveis apresentam falha no processo de limpeza uterina associada a uma migração exacerbada de polimorfonucleares para o útero, o que resulta em uma resposta inflamatória, com migração de neutrófilos atraídos pela quimiotaxia originada pela presença de um agente externo, tornando o ambiente uterino incompatível com o desenvolvimento embrionário (TROEDSSON, 1999).

Durante os processos quimiotáticos nas infecções bacterianas, a resposta inicial do hospedeiro inclui uma produção exacerbada de citocinas, pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17A e IFN- γ) promovem ativação e fagocitose de macrófagos, aumento de imunidade mediada por células e estimulação da síntese de proteínas de fase aguda (MENDONÇA, 2016). As citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) têm função imunorregulatória e no desenvolvimento da resposta imunológica humoral pela promoção de diferenciação de células B e produção de anticorpos (BURTON et al., 2009).

Em éguas que apresentam endometrite, o perfil das citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , e IFN- γ) não foram definidas claramente e pouco se sabe sobre sua cinética em casos de ocorrência natural ou mesmo qual o padrão de resposta imune (TH1 ou TH2) no ambiente uterino destes animais (MENDONÇA, 2016). Porém, sabe-se que esses mediadores atraem maior quantidade de células de defesa para o sítio da inflamação, favorecendo o acesso dessas células e melhorando a competência da eliminação do agente. Sendo as prostaglandinas responsáveis por causar alterações na permeabilidade vascular, as citocinas por manter ativo o processo inflamatório e as elastases, collagenases e gelatinases por beneficiarem o aporte de células, promovendo um processo de reparação imediato. O óxido nítrico torna-se encarregado de promover a lise de bactérias já fagocitadas pelos neutrófilos (MACKAY, 2000).

2.7 Principais patógenos associados à endometrite

Os microrganismos são os agentes infecciosos causadores da inflamação em todos os tipos de endometrite, exceto da endometrite persistente pós-cobertura, sendo mais comum a infecção por bactérias do que por fungos. As bactérias mais frequentemente isoladas do útero da égua são *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Outras bactérias aeróbias isoladas do útero de éguas incluem *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Actinobacter* spp., *Proteus* spp., e *Citrobacter* spp. (TROEDSSON, 2011).

Benko et al., (2015), ao avaliarem culturas microbiológicas de 437 éguas inglesas em um período de 6 anos, observaram que 69,7% das culturas foram positivas para microrganismos patogênicos, sendo os mais prevalentes *Streptococcus* β -hemolíticos, correspondendo a 40,4% das amostras positivas, seguido de *Escherichia coli*, que corresponderam a 20,4 % das amostras. Já em estudos realizados por Goncagül &

Seyrek-intaş (2013), ao avaliarem swabs de 247 úteros de éguas, observaram um total de 61,1% de amostras positivas, sendo 21,9% positivo para *Escherichia coli*; 15,9% para *Streptococcus α-hemolíticos*; 15,4% para *Streptococcus β-hemolíticos*; 12% para *Bacillus* spp.; 10,5% para *Streptococcus γ-hemolíticos*; 5,7% para bactérias coliformes e 3,0% *Staphylococcus aureus*.

No Brasil, estudos realizados com 64 éguas, oriundas do município de Campos dos Goytacazes – RJ das quais 29 se apresentaram sadias ao exame citológico e clínico e 35 apresentaram exame citológico positivo, dentre as quais 17 apresentaram sintomatologia clínica de endometrite e 18 não apresentaram sintoma clínico algum no exame ginecológico. Foi observado que, na população total de éguas que tanto se apresentaram sadias ao exame clínico e citológico, entretanto positivas a cultura bacteriana, o isolamento de maior frequência foi *Escherichia coli* em 53,33%, seguido por *Serratia* sp. com frequência de 13,30%, *Pleomórficos* gram-positivos com frequência de 13,33% e *Enterobacter* sp. em 10% dos animais. As bactérias presentes apenas em animais clinicamente e citologicamente positivos para endometrite foram *Protheus* sp. com percentual de 11,43% de apresentação, *Streptococcus β-hemolítico* com percentual de 14,29%, *Klebsiella* sp. com percentual igual a 8,57% e *Pseudomonas aeruginosas* com percentual de 2,86%. A bactéria de maior prevalência também foi a *E. coli*, nas éguas citologicamente sadias como nas que apresentavam exame citológico positivo (CÂMARA et al., 2013).

Oliveira et al. (2010) em um estudo com 25 éguas de diversas raças oriundas da Zona da Mata de Pernambuco, relatam o crescimento bacteriano em 39% dos animais que não possuíam inflamação uterina de acordo com o diagnosticado no exame citológico, com o isolamento de *E. coli* em 28% das éguas sadias e o citológico negativo. Como também observaram a prevalência de 25% para *E. coli*; 25% para *Klebsiella* spp.; 25% *Shigella* spp. e 25% para *Bacillus* spp. em animais com presença de processo inflamatório.

Os fungos são microrganismos oportunistas, e os fatores predisponentes para seu desenvolvimento intrauterino são queda da imunidade, desequilíbrio da flora vaginal pelo uso indiscriminado de antibióticos e a má conformação vulvar. Devido a isso, é comum que a endometrite fúngica tenha caráter crônico. Os principais agentes causadores de endometrite fúngica são *Aspergillus* sp. e *Candida* sp. (NOVELLO, et al., 2017).

Apesar das infecções bacterianas em casos de endometrite na espécie equina serem mais comuns do que as fúngicas (TROEDSSON, 2011), a incidência de endometrite fúngica tem aumentado consideravelmente (BELTAIRE, et al., 2012). Batista, et al., (2008) demonstram a prevalência de 60% de casos de endometrite fúngica, causada por *Candida* sp. em culturas microbiológicas de éguas oriundas da Zona da Mata de Pernambuco. Assim como, Ribas et al., (2014) demonstraram resultados com prevalência de 20,8% de endometrite fúngica, sendo *Candida* sp. o fungo mais prevalente, houve também incidência de fungos filamentosos como o *Trichosporon penicillatum*. Trabalhos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa em que os dados estão sendo publicados demonstram uma prevalência de 30,2 % de endometrite fúngica, sendo *Aspergillus* spp e *Candida albicans*, *Curvalaria* spp, *Cladosporium* spp. e *Zygomices* spp. os fungos isolados nas amostras processadas.

2.8 Virulência e Resistência microbiana

Define-se por virulência, a capacidade quantitativa de um agente infeccioso em provocar doença e permanecer dentro do hospedeiro (BROOKS et al., 2009). A sobrevivência desses patógenos sobre condições adversas impostas pelo ambiente é possível pela expressão de seus diferentes fatores de virulência (THÄNERT et al., 2017), cujas funções primárias são inibir as respostas imunitárias do hospedeiro e contribuir para patogênese da infecção (ÜNA et al., 2012).

Para a maioria das bactérias patogênicas, a virulência é multifatorial e requer duas classes de determinantes. Os determinantes de primeira classe englobam genes que participam em processos fisiológicos necessários para a sobrevivência em ambientes, que podem ser em hospedeiros ou não; este tipo de gene é geralmente encontrado em bactérias patogênicas e não patogênicas. Na segunda classe de determinantes estão agrupados genes de virulência que são caracteristicamente relacionados a bactérias patogênicas (GROISMAN & OCHMAN, 1996).

Dentre os fatores de virulência que estão relacionados às bactérias patogênicas do útero equino, pode-se citar a formação de biofilme, fato este de grande relevância tendo em vista que, estudos comprovam que *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia*, são capazes de produzir biofilme *in vitro* (FERRIS et al., 2016; FERRIS et al., 2014; LONCAR et al., 2015; BEEHAN et al., 2015). Como também, *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. possuem a mesma capacidade (VARGAS et al., 2018).

Outro fator importante como mecanismo de sobrevivência dos microrganismos é a resistência a agentes antimicrobianos. Através dela foram selecionadas características pelas quais as bactérias tornaram-se capazes de escapar da ação dos fármacos. Com o passar das décadas, essa resistência sofreu um aumento considerável, estabelecendo-se como uma das principais preocupações em saúde pública (KUEN, 1994).

As bactérias podem adquirir genes de resistência aos antimicrobianos através da mutação gênica ou como consequência da aquisição de genes de resistência. Neste último caso, os genes de resistência podem residir em plasmídeos que contêm outros genes que permitem sua seleção em ambientes nos quais haja a presença seletiva de antimicrobianos (RODRIGUEZ & MENÉNDEZ, 2005).

Na medicina veterinária, o uso intensivo de antimicrobianos pode resultar na seleção de bactérias resistentes, tornando a ação dos princípios ativos menos eficazes (VAZ, 2009) e permitindo que bactérias patogênicas se adaptem ao ambiente competitivo. A associação de fatores de virulência e resistência a antibióticos são importantes mecanismos necessários para sobrevivência das bactérias sob condições adversas (BECEIRO, et al., 2013).

Estudos realizados por Bandeira et al. (2017), ao avaliarem o perfil de sensibilidade/resistência a antibióticos, de bactérias isoladas do útero de éguas crioulas, observaram que o maior percentual de resistência ocorreu para as drogas que fazem parte da classe dos β -Lactâmicos, sendo 77% resistentes à Ampicilina e 64% à Penicilina.

Em nosso laboratório (dados no prelo para publicação) ao serem avaliadas 95 amostras uterinas positivas na cultura microbiológica de éguas da zona da mata e do agreste pernambucano, foi observado uma taxa de 100% de resistência para os antibióticos β -Lactâmicos, para bactérias do gênero *Klebsiella* sp. Além disso, todas as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. que foram submetidas ao teste de antibiograma apresentaram 100% de resistência para todos os antibióticos testados, sendo eles: Tetraciclina, Neomicina, Estreptomicina, Azitromicina, Gentamicina e Penicilina.

Diante desses dados, é possível afirmar que o uso de Penicilina para o tratamento de endometrite bacteriana em éguas, atualmente é ineficaz. Isso pode ocorrer devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos no combate a esses microrganismos o que levou à seleção de cepas resistentes de *Staphylococcus* spp., prejudicando a eficácia do tratamento com os β -Lactâmicos (HAVERI et al. 2005), e o motivo mais comum para essas drogas deixarem de ser eficazes é a produção da enzima beta-lactamase pelos

microrganismos resistentes, que é codificada pelo gene *blaZ* e dá origem a hidrólise do anel beta-lactâmico das penicilinas (OLSEN et al. 2006).

2.9 Biofilme em casos de endometrite

Biofilmes microbianos são comunidades complexas formadas por uma ou múltiplas espécies de microrganismos, os quais estão envolvidos por uma camada fina e viscosa composta por produtos extracelulares, particularmente polissacarídeos, além de proteínas e ácidos nucleicos. A formação do biofilme ocorre a partir de células planctônicas, que se fixam em superfícies, onde passam a produzir uma matriz de exopolissacarídeos, para que outros microrganismos possam se agregar e organizar funções dentro desta comunidade, favorecendo a sobrevivência de toda comunidade (MADIGAN et al., 2010; TORTORA et al., 2012; SALIMENA, 2014).

São três as etapas desenvolvidas pelos microrganismos para formação do biofilme: adesão inicial a uma superfície sólida; formação de microcolônias e por fim, diferenciação de micro-colônias envoltas por exopolissacarídeos (COSTERTON et al., 2002). Todos esses mecanismos são executados a partir de uma forma de comunicação intrínseca aos microrganismos chamada de *quorum sensing*, o qual permite que as bactérias coordenem atividades dentro da comunidade, contribuindo com sua estrutura e organização (TORTORA, et al., 2012).

Alguns estudos demonstram que os mecanismos que as bactérias utilizam para desenvolver os biofilmes são complexos e necessitam da participação de muitos tipos de proteínas e genes, dentre eles os antígenos capsulares PS/A chamado de polissacarídeo capsular/adesina, o qual confere a capacidade de os microrganismos se aderirem a superfícies bióticas e abióticas, e o PIA (polissacarídeo intercelular adesina) que está relacionado à capacidade multiplicação dos microrganismos para formar o biofilme. Estes polissacarídeos são sintetizados a partir da liberação de proteínas codificadas pelo gene *icaABCD*, sendo desta forma fundamental para formação de biofilme e de outros fatores de virulência (O'TOOLE et al., 2000; NASR, et. al., 2012).

Ferris et al. (2016), utilizando um modelo de endometrite infecciosa em éguas, conseguiram evidenciar uma infecção uterina envolvida por biofilme, onde foi possível observar que as microcolônias de exopolissacarídeos são multifocais, com a maior aderência ocorrendo entre as dobras do tecido e nos cornos uterinos e que as bactérias estão em maior número nas porções mais profundas das glândulas endometriais em comparação com a superfície luminal. Além disso, foi observado que há uma alteração

na resposta imune do hospedeiro com uma redução da ação de neutrófilos polimorfonucleares em torno das áreas de biofilme aderente em comparação com áreas livres de bactérias. Isso pode levar a um diagnóstico de um animal falso negativo em virtude da dificuldade de isolamento dessas bactérias que se encontram nas porções mais profundas das glândulas endometriais (VARGAS et al., 2019).

Alguns estudos também evidenciam que a maioria dos isolados de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia* são capazes de produzir um biofilme *in vitro* (FERRIS et al., 2016; FERRIS, et al., 2014; LONCAR et al., 2015; BEEHAN et al., 2015).

Os fungos possuem alta capacidade de aderência em superfícies, portanto são, excelentes candidatos à formação de biofilme. Muitos trabalhos e revisões sobre formação de biofilme fúngico foram publicados usando modelos de pesquisa de leveduras como *Candida* spp. e *Saccharomyces* spp. ou fungos semelhantes a leveduras, como *Aerobasidium pullulans* e *Cryptococcus neoformans* (HARDING et al., 2009).

Vargas et al. (2018) ao relatarem o uso de ozonioterapia em um caso de endometrite crônica em uma égua de 19 anos, com endometrite causada por uma infecção mista em *Aspergillus* spp. e *E. coli*, observaram que ambos os agentes apresentaram capacidade de produzir biofilme *in vitro*, o que reforça ainda mais a severidade de um quadro de endometrite fúngica, no que diz respeito ao prognóstico e tratamento.

A formação do biofilme confere uma série de vantagens aos microrganismos como resistência aos agentes antimicrobianos, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, virulência acentuada, cooperação metabólica, troca de material genético e comunicação (AKBARI; KJELLERUP, 2015; MELLO et al., 2016).

Isso ocorre devido ao fato de que os microrganismos que vivem em um biofilme apresentam, uma grande necessidade de adquirirem elementos genéticos transmissíveis a taxas aceleradas. A conjugação ocorre naturalmente entre as bactérias, mas parece ser acelerada quando as bactérias estão em um estilo de vida de biofilme. Isso permite a rápida transferência horizontal de material genético, tornando o biofilme um meio perfeito para o surgimento de novos patógenos por meio da aquisição de resistência a antibióticos, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência ambiental (FERRIS, 2017).

James et al. (1995), mostraram em seu experimento que a espessura do biofilme depende do número de organismos que o compõe. Em culturas puras de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, o biofilme tem 15µ e 30µ respectivamente.

Entretanto, a espessura do biofilme contendo as duas espécies apresenta cerca de 40 μ , o que leva a crer que uma espécie colabora com a outra. Este fato é importante, pois uma camada espessa de exopolissacarídeos contribui como fator de resistência antimicrobiana dos biofilmes, uma vez que impede o transporte de massa de antibióticos através do biofilme, provavelmente por se ligarem diretamente a estes agentes (DONLAN, 2000).

Assim, uma das características mais impressionantes e consistentemente relatadas das populações microbianas que crescem como biofilmes é o aumento da resistência intrínseca aos agentes antimicrobianos. Como resultado, agentes antibióticos e biocidas convencionais frequentemente falham em erradicar microrganismos infecciosos de hospedeiros ou de superfícies duras inertes quando presentes em um biofilme (HARDING et al., 2009).

2.10 Tratamentos convencionais e não convencionais

O delineamento do tratamento mais adequado está intimamente relacionado à identificação da etiologia da enfermidade, desse modo é crucial sua determinação para a realização dos tratamentos mais indicados e eficazes para cada paciente. Geralmente as terapias incluem a combinação de medicações, comumente antimicrobianos, correção de defeitos anatômicos e utilização de anti-inflamatórios (LEBLANC, 2010; MACIEL, 2016). Tratamentos que parecem modular ou mesmo suprimir a resposta imune como forma de reduzir a inflamação uterina reprodutiva tem sido estudada nos últimos anos. O uso de esteróides ou imunomoduladores pode aumentar as taxas de éguas com acúmulo de líquido uterino ou inflamação (REGHINI, 2016).

Alguns tratamentos podem atuar como uma forma preventiva da instalação da infecção, visando à eliminação de fatores que predisponham ao processo inflamatório pós-cobertura, e outros podem atuar diretamente como curativos para os processos inflamatórios do útero, tais como:

2.10.1 Lavagem uterina

A lavagem uterina é empregada como forma de promover uma limpeza física do endométrio, facilitando a ação de drogas a serem infundidas posteriormente, como antibióticos, que não agem satisfatoriamente na presença de pus ou tecidos necróticos. Além disso, a lavagem uterina estimula a liberação de ocitocina endógena. Para lavagem, geralmente usa-se solução fisiológica Ringer com Lactato aquecida ou não,

introduzida através de uma sonda para coleta de embrião logo depois da limpeza com clorexidina 2% de toda a região vulvar e perineal da égua e a utilização de bandagem na cauda para evitar contaminação no momento da lavagem (ROMEIRAS, 2017). Lavagens uterinas realizadas entre 6 e 12 horas pós-cobertura resultaram em melhores taxas de prenhez em éguas com histórico de endometrite persistente pós-cobertura (EPCC) em vários ciclos consecutivos (KNUTTI et al., 2000).

A taxa de prenhez de éguas apresentando fluido uterino e submetidas a lavagens uterinas, 36 a 48 horas pós-cobertura, foi inferior à de éguas que não apresentaram EPCC (MALSCHITZKY et al., 2002).

Lavagens uterinas realizadas 24 horas após infecção experimental com *Streptococcus zooepidemicus* não foram eficientes na eliminação bacteriana (MATTOS et al. 1997), possivelmente devido à aderência bacteriana à parede do endométrio. Portanto, os tratamentos devem ser sempre realizados tendo como referência o momento da cobertura e não o da ovulação, preferencialmente entre 6 e 12 horas após o serviço, antes do estabelecimento de uma infecção bacteriana e sem prejuízo para o transporte espermático e para a sobrevivência do corpo lúteo.

2.10.2 Drogas Ecbólicas

A ocitocina é o método de tratamento não invasivo e que frequentemente fornece cedo e completa eliminação de qualquer fluido intrauterino (PYCOCK, 2009). Ela pode ser administrada logo após 4 horas da inseminação e dosada repetidamente nas próximas 24 a 48 horas para eliminar o líquido do útero (CAUSEY, 2007). A dose baixa de ocitocina (10 UI / égua) por via intravenosa produz boas contrações que ajudam a expelir o fluido uterino. Uma maior duração da atividade pode ser obtida por administração intramuscular (20 UI / égua). Cloprostenol (250mcg / égua) ou dinoprost (5mg / égua) também podem produzir contrações uterinas significativas (ENGLAND, 2005). A PGF2 α , embora resulte em um período mais longo de atividade mioelétrica (TROEDSSON et al., 1993), tem um efeito semelhante ao obtido com altas doses de ocitocina (NIE et al, 2002).

2.10.3 Antibiotecoterapia

A endometrite é comumente tratada por infusão intrauterina de um antibiótico apropriado em um período de 3 a 7 dias, dependendo do grau de infecção, durante o

estro (LEBLANC & CAUSEY, 2009). O volume de fluido usado para antibiótico depende do tamanho do útero. Um volume total de 30 a 60 mL geralmente é o suficiente (TROEDSSON, 2011). Os antibióticos mais comumente utilizados nas infusões intrauterinas são o Ceftiofur, seguido da Gentamicina, Ticarcilina com Ácido Clavulânico, Ampicilina, Penicilina Procaína, Amicacina, Penicilina Potássica e Ticarcilina (DASCANIO, 2011). Sendo que a grande maioria desses fármacos, com exceção da Amicacina, não apresentam indicação para uso tópico intrauterino (VIANA, 2014).

Este fato é importante, pois o desenvolvimento da resistência bacteriana é, até o presente momento, considerado inexorável e o uso de antimicrobianos com espectro maior do que necessário associado a um esquema posológico inadequado são fatores que facilitam a seleção de cepas resistentes (MANRIQUE & GALVÃO, 1996).

Um dos grandes impasses para realização de um tratamento eficaz de endometrites bacterianas está associado à ocorrência de infecções ocasionadas por bactérias produtoras de biofilme, essas bactérias se mostram muito mais resistentes ao tratamento com antibioticoterapia do que as não produtoras, devido às espessas camadas de exopolissacarídeos, DNA, RNA, lipídeos e proteínas que formam o biofilme impedirem a penetração dos antibióticos para o interior dessas comunidades. Assim, quando um determinado agente antimicrobiano entra em contato com a mucosa uterina provoca a morte dos microrganismos que se encontram livres no útero, sendo estes patogênicos e não patogênicos, e apenas uma pequena quantidade do antibiótico consegue penetrar o biofilme e atingir as colônias de microrganismos que vivem em latência nas comunidades favorecendo o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos (FERRIS, 2017).

Apesar de os tratamentos com infusões de antibióticos intrauterinos serem utilizados na rotina médica há décadas, alguns trabalhos mostram que não existem diferenças significativas nas taxas de prenhez, quando comparadas, éguas que foram tratadas com infusão de antibióticos intrauterinos e éguas que foram submetidas apenas a lavagem uterina em casos de endometrite persistente pós-cobertura (MALSCHITZKY et al., 2002). Isso pode ser justificado, pelo fato de que a inflamação causada pelos mecanismos fisiológicos envolvidos na reprodução pode provocar a ativação de microrganismos latentes no útero, deixando-os expostos e mais sensíveis no lúmen uterino, podendo ser tratadas apenas com a ação mecânica do lavado uterino (CHRISTOFFERSEN et al., 2015).

Devido às dificuldades de elucidação de infecções ocasionada por bactérias produtoras de biofilme surge a necessidade de novos protocolos terapêuticos de maior eficácia (FERRIS, 2017).

O uso de N-acetilcisteína apresentou redução significativa nas UFCs e produção de biofilme de *Pseudomonas Aureginosa*, *Escheria Coli* e *S. zooepidemicus*, porém não foram observados resultados relevantes nas UFCs ou redução de biofilme de *K. pneumoniae*. O peróxido de hidrogênio 1% apresentou resultado efetivo na diminuição de UFCs e de biofilme em isolados de *E. coli* e *S. zooepidemicus*, sendo observado resultados mais efetivos quando usada a concentração de 1% comparada a concentração de 0,5%. Ácido Hipocloroso, não demonstrou resultados efetivos na redução de UFCs ou de biofilme nos isolados testados. (FERRIS, 2017)

Não foram observados resultados efetivos na diminuição de UFCs ou biofilme em colônias de *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, e *S. zooepidemicus* após o uso de terapia com ozônio por 6 horas. Porém observou-se diminuição relevante quando realizado a terapia com ozônio associado a antibioticoterapia (FERRIS, 2017).

Apesar do uso de antimicrobianos, ser o tratamento de eleição na grande maioria dos casos de endometrites, é necessário que seja utilizado com cautela e preferencialmente após a determinação do agente etiológico específico. O uso indiscriminado pode levar a complicações, uma vez que lavados intrauterinos pode predispor a ocorrência de endometrites fúngicas e o uso de antibióticos sistêmico pode levar a problemas gastrointestinais, assim como ao desenvolvimento de bactérias cada vez mais resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado e, conseqüentemente, tornando o tratamento de infecções bacterianas cada vez mais difícil. (SCOGGIN, 2016).

Desta forma, uma das principais estratégias que pode ser adotada para evitar a resistência bacteriana é o uso racional dos antibióticos, pois para que determinado agente antimicrobiano apresente níveis séricos satisfatórios é necessário que os processos de absorção, distribuição e eliminação sejam eficientes e para tanto o respeito às doses e vias de administrações são fundamentais (HOEFEL & LAUTERT 2006).

2.10.4 Antifúngicos

A terapia para endometrite fúngica envolve o tratamento da infecção ativa por meio de métodos como lavagem uterina com ácido acético diluído ou iodopovidona diluída, além de infusão sistêmica e / ou intrauterina de agentes antifúngicos, bem como

correção de fatores predisponentes que podem resultar em falha no tratamento (FERRIS, 2017). Contudo, para tratamento de éguas contaminadas com fungos, recomenda-se que seja feita a infusão intrauterina de 5000 UI de Nistatina por 7 a 10 dias, ou 3200 mg de Cetoconazol durante o mesmo período. Na Medicina Veterinária, existem duas classes de drogas antifúngicas que são comumente usadas: os azóis e os polienos. Estas drogas interferem na membrana citoplasmática de fungos por ligação ao ergosterol (polienos) ou inibindo a sua síntese (azóis). Em geral, polienos têm uma atividade fungicida contra a maioria dos fungos patogênicos, enquanto os azóis são considerados fungistáticos, ou seja, inibem o crescimento dos fungos (COUTINHO DA SILVA; ALVARENGA, 2011).

A lavagem uterina com ácido acético 2% (vinagre) é bastante utilizada, porém o seu uso deve ser de forma cautelosa devido ao seu baixo nível de pH (próximo a 3). Deve ser administrado diluído em solução fisiológica em tempo médio de 3 a 5 minutos para que assim evite uma severa irritação uterina. Utiliza-se solução ringer com lactato para retirar o excedente do vinagre (ALVARENGA, 2008).

Outro tratamento utilizado é a infusão de iodopovidona (0,05 a 0,1%), que da mesma forma do ácido acético, deve ser utilizado com cuidado, uma vez que há relatos de que o mesmo pode causar graves danos ao endométrio, incluindo fibrose e formação de aderências (ALVARENGA, 2008). Arruda et al., (2003), observaram que a infusão intra-uterina com iodopovidona induziu inflamação intensa e aderências intra-uterinas, gerando severa fibrose persistente.

Outros agentes utilizados incluem o dimetilsulfóxido (DMSO), agindo como tratamento complementar devido à sua atividade contra o crescimento da *C. albicans*, *in vitro* (DASCANIO et. al., 2001; DASCANIO, 2007).

Bracher et al., (1991), ao estudarem o efeito intrauterino da infusão de querosene (50mL) no endométrio observaram níveis de moderada a severa inflamação inicialmente após a infusão, sendo que metade das amostras apresentaram suave a severa necrose do epitélio luminal, sem ocorrer melhora do processo degenerativo. As glândulas endometriais apresentaram-se mais ativas em todas as éguas, e células mononucleares dominaram o infiltrado celular. Entre os dias 14 a 21 após a infusão, o infiltrado celular retornou-se ao nível do pré-tratamento, entretanto a atividade glandular chegou ao normal por volta do D 14 e diminuiu superficialmente por volta do D 21 pós-tratamento com querosene, sem ocorrer melhora do processo degenerativo (MARTINS; PIMENTEL, 2006).

2.10.5 Plasma Rico em Plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) trata-se de um concentrado de proteínas de caráter biológico, utilizado em terapias, que consiste em retirar uma quantidade de sangue do próprio animal ou de outro animal sadio. Este é derivado do sangue total e devem conter entre três e cinco vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos (MONTEIRO, et. al. 2019).

Existem outros componentes atuando juntamente com o PRP, os leucócitos e as células brancas, que garantem a resistência natural aos fatores que dizem respeito a processos infecciosos ou alérgicos. Por isso a importância destes componentes, sendo que a sua principal função do organismo é a defesa contra os agentes estranhos. Esse concentrado visa atenuar ou até mesmo interromper o processo inflamatório e promover a recuperação do endométrio lesado através da sua ação mitogênica e neovascular. Existem vários métodos para se obter o PRP, no entanto, a centrifugação é o método mais utilizado por ser de fácil execução e de baixo custo (MONTEIRO, et al. 2019).

Estudo feito por Reghini (2004) pode-se concluir que o tratamento utilizando PRP reduziu a resposta inflamatória após cobertura, particularmente em éguas consideradas susceptíveis. Já em pesquisa realizada por Monteiro, et al. (2019), concluiu-se que o PRP pode ser utilizado como adjuvante às terapias de suporte na tentativa de modular a resposta inflamatória pós-cobertura em éguas e com isso melhorar as taxas de fertilidade, pois de acordo com a pesquisa, após as plaquetas serem ativadas, há uma liberação de fatores de crescimento, tais como: fator de transformação de crescimento β (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento epidermal derivado das plaquetas (PDEGF), fator de crescimento hepatocitário (HGF), tromboplastina plaquetária, visto que estes fatores agem regulando o metabolismo celular, com isso haverá uma reparação tecidual e atuando sobre a inflamação.

2.10.6 Células tronco

Células-tronco obtidas de medula óssea têm sido usadas na prática médica como fonte de células hematopoiéticas e os transplantes de medula fazem parte do tratamento de doenças hematológicas há várias décadas. As células-tronco hematopoiéticas

promovem a reconstituição hematopoiética e de outros tecidos, estando presentes no embrião, sangue periférico, medula óssea e sangue do cordão umbilical (HERZOG et al., 2003).

Na medula óssea há um outro tipo de células tronco denominada célula tronco mesenquimal (CTM) que têm alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Em determinadas condições, as CTM podem dar origem a células de diversos tecidos incluindo cartilagem, osso, músculo e gordura (REYES, et al., 2001).

Em outro estudo, Pavão, (2013), pode concluir que o tratamento de éguas com processo crônico degenerativo com células tronco mesenquimais (CTMs) oriundas da medula óssea foi eficiente em melhorar a arquitetura histológica no que diz respeito a atividade e distribuição glandular e bem como levou a diminuição do tecido fibrótico.

Ferris et al. (2014) avaliaram a capacidade do soro autólogo (SCA) e das CTMs na modulação da resposta inflamatória ao desafio dos espermatozoides após acasalamento em éguas saudáveis, e encontraram uma diminuição considerável do número de neutrófilos no lúmen uterino 6 horas após a IA. Além disso, o uso das CTMs ainda proporcionou um aumento da citocina antiinflamatória IL-1. As CTMs têm como função secretar moléculas bioativas em resposta a lesão tecidual e o soro condicionado autólogo tem altas concentrações de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento.

2.10.7 Imunomoduladores

A administração de imunomoduladores tem por objetivo o alcance do equilíbrio da expressão das citocinas pró e anti-inflamatórias e a reposição da homeostasia da resposta inflamatória local, colaborando para diminuição da endometrite relacionada à cobrição e aumento da taxa de concepção (FUMUSO et al., 2003; PASOLINI et al., 2016).

Podem ser utilizados glucocorticoides, estes suprimem a resposta imunitária, diminuem a expressão das citocinas pró-inflamatórias, promovem melhorias dos mecanismos de defesa uterina e melhoram a resposta anti-inflamatória. Dessa forma, o estabelecimento de uma terapia de curta duração utilizando corticosteroides pode ser benéfica no tratamento da endometrite associada à cobrição, existindo uma diminuição

da severidade e tempo da resposta inflamatória (LeBLANC & CAUSEY, 2009; WOLF, et al., 2012).

Entretanto, o estabelecimento do tratamento com corticosteroides deve ser realizado de forma prudente, visto que estes podem promover uma exacerbação da infecção nas éguas com endometrite bacteriana (LeBLANC & CAUSEY, 2009).

2.10.8 Ozonioterapia

Dentre os tratamentos utilizados, o uso do O₃ tem entrado como alternativa no tratamento de endometrites. O O₃ ajuda na estimulação de linfócitos e monócitos para auxiliar na liberação de várias citocinas que melhoram o tecido de regeneração e iniciar os processos de tecido granulação e formação epitelial. O O₃ rompe a membrana celular dos microrganismos (DURRANI, 2017). O tratamento intrauterino com O₃ proporciona um ambiente mais favorável para inseminação e fertilização, pois age na redução dos efeitos espermicidas como também da inflamação decorrente da endometrite (CAMPOS, 2018).

Os efeitos da ozonioterapia são:

Oxygenante – Aumenta a capacidade do sangue de absorver e transportar mais oxigênio para todo o corpo, melhorando assim a circulação, e consequentemente o metabolismo celular;

Antioxidante – Elimina os radicais livres, sendo o único meio conhecido até o momento para poder estimular todas as enzimas antioxidantes celulares e retardar os processos de envelhecimento celular;

Imunomodulador – Estimula o sistema imunológico celular ou humoral, e modular no caso de doenças auto-imunes. Isso vai depender da dose administrada; Células imunocompetentes são ativadas com indução de citocinas como interferons, interleucinas e fatores de crescimento, moléculas sinalizadoras, provocando a modulação do sistema imunológico.

Melhora na circulação - promove a liberação de óxido nítrico e consequente vasodilatação.

Regenerador – Promove a reparação de vários tecidos, sendo muito útil em processos de difícil cicatrização;

Analgésico e anti-inflamatório – Neutraliza os mediadores neuroquímicos da dor e facilita o metabolismo e a eliminação de histamina, quinina, entre outros. (BOCCI,

1993). O O_3 atua diretamente sobre os mediadores químicos do processo inflamatório. Inibe a produção de prostaglandinas, a formação do ácido aracdônico e atua indiretamente sobre as citocinas, bloqueando o processo inflamatório (VIGLINO, 2008)

Além disso, o O_3 atua tanto como bactericida quanto fungicida devido ao processo oxidativo dos peróxidos presentes na microbiota que são destruídas pelo O_3 (DURRANI, 2017). Na ação contra microrganismos não existe um mecanismo para criarem resistência. O O_3 ataca a membrana plasmática de bactérias pelos glicolipídeos ou aminoácidos como o triptofano e atua sobre grupos sulfidrilas de certas enzimas interrompendo a atividade enzimática de bactérias (GARCIA et al., 2014)

Vargas et al, 2019, utilizando óleos vegetais ozonizados na dose de 40 ml na extremidade de cada corno uterino, observaram uma eficiente remoção do biofilme uterino em 100% das éguas doadoras de embriões tratadas e com histórico de endometrites recorrentes. As taxas de recuperação embrionária foram de 62,5% pós-tratamento.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARI, F., KJELLERUP, B.V. **Elimination of Bloodstream Infections Associated with Candida albicans biofilm in intravascular catheters.** Pathogens. v.4, p.457-469, 2015.

ALVARENGA, M.A. **Diagnóstico e tratamento de endometrite fúngica em éguas.** In: IX Conferência Anual da ABRAVEQ, 2008. São Paulo-SP, Brasil. Anais... São Paulo. 2008.

ALVAREZ, E.A.G. **La ozonoterapia intrauterina en el tratamiento de la endometritis subclínica bovina.** 2013. 91F. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agropecuárias, Universidade de Cuenca, Equador, 2013.

ALVES, G.E.S.; ABREU, J.M.G.; RIBEIRO FILHO, J.D.; MUZZI, L.A.L.; OLIVEIRA, H.P.; TANNUS, R.J.; BUCHAMAN, T. **Efeitos do ozônio nas lesões de reperusão do jejuno em equinos.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.56, n.4, p.433-437, 2004.

AMORIM, M.D., GARTLEY, C.J., FOSTER, R.A., HILL, A., SCHOLTZ, E.L., HAYES, A., CHENIER, T.S. **Comparison of Clinical Signs, Endometrial Culture, Endometrial Cytology, Uterine Low-Volume Lavage, and Uterine Biopsy and Combinations in the Diagnosis of Equine Endometritis.** Journal of Equine Veterinary Science, v. 44, p.54–61, 2016.

ARRUDA, R.P., SOUZA, L.W.O., CELEGHINI, E.C.C., SOUZA, F.A.C. **Tratamento das endometrites em éguas.** In: I Simpósio de Medicina Equina, 2003. Curitiba-PR, Brasil. Anais...Curitiba-PR, p. 03-13, 2003.

BAILEY, P.; **Ozonolysis of Olefins: Introduction, Initial Ozone Attack and Adduct; The Peroxides Products.** Ozonization in Organic Chemistry, Academic Press: New York, 1978.

BANDEIRA, R.S., THOMASINI, J., LORENZET, G., MARTINS, G.V., NOVELLO, G., FRANÇA, R.T., LISBOA, F.P. **Avaliação microbiológica e teste de sensibilidade in vitro de bactérias isoladas do útero de éguas da raça Crioula.** Rev. Acad. Ciênc. Anim. v.15, n.1, p.127-128, 2017.

BATISTA, I.O., OLIVEIRA, A.A.F., PINHEIRO JÚNIOR, J.W., PEIXOTO, R.M., TELES, J.A.A., MOTA, R.A. **Endometrite por *Candida* sp. e outros microrganismos associados em éguas doadoras de embrião na Zona da Mata do Estado de Pernambuco** – Brasil. Medicina Veterinária, v. 2, n. 4, p. 41-44, 2008.

BECEIRO, A., TOMÁS, M., BOU, G. **Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?** Clinical Microbiology Reviews. v.26, p.185-230, 2013.

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

BEEHAN, D.P, WOLFSDORF, K., ELAM, J., KREKELER, N., PACCAMONTI, D. **The Evaluation of Biofilm-Forming Potential of *Escherichia Coli* Collected From the Equine Female Reproductive Tract.** J. Equine Vet. Sci., v.35, p.935-39, 2016.

BELTAIRE, K.A., CHEONG, S.H., SILVA, M.A.C. **Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns.** Equine Veterinary Journal. v.43, p.84–87, 2012.

BENKO, T.M., BOLDIZAR, F.N., HURA, V., KARAMANOVA, M., PETROVIC, V. **Incidence of bacterial pathogens in equine uterine swabs, their antibiotic resistance patterns, and selected reproductive indices in English thoroughbred mares during the foal heat cycle.** Medicina Veterinaria, v.60, n.11, p. 613-620, 2015.

BHATT, J.; BHAT, A.R.; KULDEEP, D.; AMARPAL, A. **An overview of ozone therapy in equine-an emerging healthcare solution.** J.E.B.A.S. v.4, p.203–210, 2016.

BOCCI V. A. **Can Ozonotherapy be Performed if the Biochemistry of the Process Cannot be Controlled?** Archives of Medical Research, Siena, v.38, p.584-585, 2007.

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

BOCCI, V. et al. **The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug.** Wiley Interscience, Siena, p.646-682, 2009.

- BOCCI, V. **Ozone. A new medical drug**. 2. ed. Siena: Springer. p.132. 2011.
- BOCCI, V.L., CORRADESCI, E.F., PAULESU, L., ROSSI, R., CARDAIOLI, E., DI SIMPLICIO, P. **Studies on the biological of ozone**. Mediators of Inflammation, v.7, p.313–317, 1993.
- BORGES, G.A.; ELIAS, S.T.; MAZUTTI DA SILVA, S.M.; MAGALHÃES, P.O.; MACEDO, S.B.; RIBEIRO, A.P.D.; GUERRA, E.N.S. **In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy**. J. Craniomaxillofac. Surg. v.45, p.364–370, 2017.
- BRACHER, V., NEUSCHA, A., ALLEN, W.R. **The effect of intra-uterine infusion of kerosene on the endometrium of mares**. J. Reprod. Fert. v.44, p.706- 707,1991.
- BRASIL**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camarassetoriaistematicas/documentos/camara-ssetoriais/equideocultura/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view>> Acesso em: 29 janeiro 2020.
- BROOKS, G.F., CARROLL, K.C., BUTEL, J.S., MORSE, S.A., JAWETZ, M.A. **Microbiologia Médica**. 24^a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2009, 820p.
- BURTON, A.B. et al. **Serum interleukin-6 (IL-6) and IL-10 concentrations in normal and septic neonatal foals**. Veterinary immunology and immunopathology, v.132, n. 2-4, p.122–128, 2009.
- CÁFARO FILHO, H.; MODA, T.F.; LIMA, C.J.; FERNANDES, A.B.; ZÂNGARO, R.A.; ANDREANI-KOZUSNY, D.I.; MOREIRA, L.H. **Tratamento de mastite em ovino causada por *Prototheca* sp. através do ozônio: relato de caso**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, Uberlândia – MG, 2014. Anais... Uberlândia, CBEB, p. 1625-1627, 2014.
- CÂMARA, W.M., CANCEMANSI, J.A.N., SHIMODA, E., FAGUNDES, B., BARRETO, M.A.P., SILVA, J.F.S. **Identificação e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isolada de éguas suspeitas ou não de endometrite**. Rev. Bras. Ciênc. Agrár. v.8, n.4, p.669-674, 2013.

CAMPOS, D.G., SÁ, N.M.B., TESTA, A.C., PINNA, A.E. **Uso do ozônio no tratamento da endometrite em éguas: relato de caso.** Revista Brasileira de Medicina Equina. v.13, p.24-26, 2018.

CANISSO, I.F., STEWART, J., SILVA, M.A.C. **Endometritis - Managing Persistent Post- Breeding Endometritis.** Elsevier Inc. v.16, p.739-749, 2016

CARDOSO, R F. **Avaliação do perfil antimicrobiano do gás ozônio.** International Ozone Association, São Paulo, 2ºed, p. 132, 2009.

CASE, P.D.; BIRD, P.S.; KAHLER, W.A.; GEORGE, R.; WALSH, L.J. **Treatment of root canal biofilms of Enterococcus faecalis with ozone gas and passive ultrasound activation.** J. Endod. v.38, p.523–526, 2012.

CAUSEY, R.C. et al. **The equine immune response to Streptococcus equi subspecies zooepidermicus during uterine infection.** Vet. J. London, v.172, n.2, p.248-257, 2006.

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

CAUSEY, R.C. **Uterine Therapy for Mares with Bacterial Infections. Current Therapy in Equine Reproduction.** Editado por SAMPER, J. C. et al. Cap. 15, p. 105-115. 2007.

CHRISTOFFERSEN, M., SÖDERLIND, M., RUDEFALK, S.R., PEDERSEN, H.G., ALLEN, J., KREKELER, N. **Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by Streptococcus zooepidemicus.** Theriogenology, v.84, p.1283-1290, 2015.

CLAVO, B.; RODRÍGUEZ-ESPARRAGÓN, F.; RODRÍGUEZ-ABREU, D.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; LLONTOP, P.; AGUIAR-BUJANDA, D.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, L.; SANTANA-RODRÍGUEZ, N. **Modulation of oxidative stress by ozone therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced toxicity: review and prospects.** Antioxidants. v.8, p.1–20, 2019.

COELHO, C.S.; BERNADI, W.A.; GINELLI, A.M.; SPAGNOL, T.; GARDEL, L.S.; SOUZA, V.R.C. **Use of ozone therapy in chronic laminitis in a horse.** Journal of

Ozone Therapy. v.1, n.1, p.2-7 2015.

CORREIA, I.M.S.; ARAÚJO, G.S., PAULO, J.B.A.; SOUZA, E.M.B.D. **Avaliação das potencialidades e características físico-químicas do óleo de Girassol (*Helianthus annuus L.*) e Coco (*Cocos nucifera L.*) produzidos no Nordeste brasileiro.** Scientia Plena. v.10, n.3, p. 1-7, 2014.

COSTERTON, J.W., STEWART, O.S., GREENBERG, E.P. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** Science, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 2002.

COUTINHO DA SILVA, M.A., ALVARENGA, M.A. **Fungal endometritis in mares.** Equine Reproduction. p.2532-2538, 2011.

DASCANIO J. **How and When to Treat Endometritis With Systemic or Local Antibiotics.** AAEP Proceedings, vol.57,pp. 24–31, 2011.

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

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

DIEL DE AMORIM, M., GARTLEY, C.J., FOSTER, R.A., HILL, A., SCHOLTZ, E.L., HAYES, A., CHENIER, T.S. **Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of Equine Endometritis.** Journal of Equine Veterinary Science, v.44, p.54-61, 2015.

DJURICIC, D.; VINCE, S.; ABLONDI, M.; DOBRANIC, T.; SAMARDZIJA, M. **Effect of Preventive Intrauterine Ozone Application on Reproductive Efficiency in Holstein Cows.** Reprod Dom Anim v. 47, p.87–91, 2012.

DONLAN, R.M. **Biofilm control in industrial water systems: approaching an old problem in new ways. Biofilms: recent advances in their study and control.** Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 333-60, 2000.

DURICIC, D.; VALPOTIC, H.; SAMARDZIJA, M. **Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge.** Animal Reproduction Science. v.

159, p. 1–7, 2015.

DURRANI, A.Z., RAZA, M.U., CHANNA, A.A. **An Alternative Therapy with Ozone to Avoid Antimicrobial Resistance (AMR) in Uterine Infections in Dairy Cattle.** Biomedical. Journal os Scientific & Technical Research. v.1, p.774-778, 2017.

ELVIS, A.M.; EKTA, J S. **Ozonoterapia: Uma revisão clínica.** J Nat Sc Biol Med. v.2, p.66-70, 2011.

ENGINLER, S.O.; SABUNCU, A.; KAHRAMAN, B.B.; KOÇAK, OMUR, YILDAR, E.; GUZEL, O. **Comparison of Intramammary Ozone Administration Doses in Dairy Cows with Clinical Mastitis.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 43, p. 1260, 2015.

ENGLAND, G.C.W. **Swabbing and Biopsy Techniques and Diagnosis of Endometritis. Fertility & obstetrics in the horse.** Cap 14. p.128-137. Oxford: Blackwell Publishing. 2005.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W. L. **Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes.** Química Nova, v. 32, n. 1. 106-11, 2009.

FERRIS, R.A. **Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective.** Rev. Bras. Reprod. Anim. v.41, n.1, p.74-80, 2017.

FERRIS, R.A., FRISBIE, D.D., MCCUE, P.M. **Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares.** Theriogenology, v. 82, n. 1, p. 36–42, 2014.

FERRIS, R.A., HENNET, M.R., BORLEE, B.R., BORLEE, G.I., MCCUE, P.M. **Detection of Bacterial Biofilm and Evaluation of the Host Immune Response Using an Experimental Model of Bacterial Endometritis.** In: Proceeding of the AAEP 62nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Orlando, Florida, 2016.

FERRIS, R.A., WITTSTOCK, S.M., MCCUE, P.M., BORLEE, B.R. **Evaluation of biofilms in gram-negative bacteria isolated from the equine uterus.** J Equine Vet Sci, v.34, p.121, 2014.

FITZPATRICK,E.; HOLLAND, O.; VANDERLELIE, J.J. **Ozone therapy for the**

treatment of chronic wounds: A systematic review. Int Wound J. p. 1–12, 2018.

FRIEL, E., SAR, S., MEE, J.P. **Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling.** Advanced Drug Delivered Reviews, v.57, p.1894-1903, 2005.

FUMUSO, E., GIGUERE, S., WADE, J., ROGAN, D., VIDELA-DORNA, I., BOWDEN, R.A. **Endometrial IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha, mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation.** Veterinary Immunology and Immunopathology, vol.96, p.31-41, 2003.

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

GALIE, M.; COSTANZO, M.; NODARI, A.; BOSCHI, F.; CALDERAN, L.; MANNUCCI, S.; COVI, V.; TABARACCI, G.; MALATESTA, M. **Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf2 dependent pathway.** Free Radic. Biol. Med. v.124, p.114–121, 2018.

GARCIA, C.A. et al. **Autohemoterapia maior Ozonizada no tratamento de Habronemose em Equino- Relato de Caso.** Faculdade de Medicina Veterinária da UFU. Campus Umuarama- Uberlândia- MG, 2008.

GARCIA, C.A., ROSSI, D.A., SILVA, D.M., MACHADO, J.C.B., CAETANO, D.P., CAMPOS, V.A. **Avaliação da eficiência do gás ozônio na descontaminação bacteriana de instrumentos cirúrgicos veterinários.** Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v. 12, n. 1, p. 47-47, 24 out. 2014.

GHASEMZADESNAVA H. et al. **A review of mare endometritis in Iran.** J. Equine Vet. Sci. v.24, n.5, p.188-192, 2004.

GHASEMZADESNAVA, H. et al. **A review of mare endometritis in Iran.** J. Equine Vet. Sci. v.24, n.5, p.188-192, 2004.

GONCAGUL, G., SEYREK-INTAS, K. **Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated from Uteri of Thoroughbred Mares with Fertility Problems.** Vet, Dergi. Journal. v.19, p.105-109, 2013.

GROISMAN, E.A., OCHMAN, H. **Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps,** Cell, vol. 87, p.791–794, 1996. Disponível em: http://www.biochem.arizona.edu/ochman/Papers/Groisman_Cell1996.pdf. Acesso em 14 de janeiro de 2020.

HADDAD, M.A. et al. **Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia.** Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, v.61, n.3, p.539-546, 2009.

HÄNNINEN K. **Contribution of Excited Ozone and Oxygen Molecules to the Formation of the Stratospheric Ozone Layer.** Environment and Ecology Research. v. 7, n. 3, p.121-134, 2019

HARDING, M.W., MARQUES, L.L.R., HOWARD, R.J., OLSON, M.E. **Can filamentous fungi form biofilms?** Trends in Microbiology. vol.17, n.11, 2009.

HAVERI, M., SUOMINEN, S., RANTALA, L., HONKANEN-BUZALSKI, T., PYÖRÄLÄ, S. **Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection.** Veterinary Microbiology. v.106, p.97–102, 2005.

HERZOG, E.L. et al. **Plasticity of marrow-derived stem cells.** Blood, v.102, n.10, p.3483-3493, 2003.

HOEFEL, H.H.K., LAUTERT, L. **Administração endovenosa de antibióticos e resistência bacteriana: responsabilidade da enfermagem.** Rev. Eletr. Enf. v.8, n.3, p.441-449. Disponível em: <Available from: http://www.fen.ufg.br/revista/revista8_3/v8n3a15.htm> Acesso em 12 de fevereiro de 2020.

HURTGEN, J. P. **Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review.** Theriogenology, v.66, p.560-566, 2006.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2018. Efetivos de rebanho, por tipo de rebanho – 2018 disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>> Acesso em: 29 janeiro 2020.

IGNÁCIO, F.S.; MONTECHIESI, D.F. **Ozonioterapia para tratamento de dermatite psicogênica em cães.** Ars Veterinaria, Jaboticabal, SP, v.34, n.4 (Suplemento), p. 141-167, 2018.

International Scientific Committee of Ozone Therapy. **Madrid Declaration Ozonotherapy.** 3^a ed. Copyright, Madrid, 2020.

JAMES, G.A., BEAUDETTE, L., COSTERTON, J.W. **Interspecies bacterial interactions in biofilms.** Journal of Industrial Microbiology. v. 15, n. 4, p. 257-262, 1995.

JARAMILLO, F.M.; VENDRUSCOLO, C.P.; FULBER, J.; SEIDEL, S.R.T.; BARBOSA, A.P.; BACCARIN, R.Y.A. **Effects of transrectal medicinal ozone in horses – clinical and laboratory aspects.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.72, n.1, p.56-64, 2020.

KATILA T. **Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus.** Reproduction in Domestic Animals. v. 47, n.5, p. 31–41, 2012.

KATILA, T. **Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis.** Reproductive Biology. v. 198, p. 8, 2016.

KATILA, T. **Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen.** Biol. Reprod. Mono. n.1, p.515-518, 1995.

KNUTTI, B., PYCOCK, J.F., VAN DER WIJDEN, G.C., KÜPFER, U. **The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding.** Equine Vet Educ, v.12, p.276-270, 2000.

KOSACHENCO, B.G.; CALIARI, C.; PEREIRA, B.A. **Ozonioterapia no tratamento de Esporotricose Felina – Relato de Caso.** In: EXPOULBRA, Canoas, 2016. Anais... Canoas, ULBRA, 2016.

KOTILAINEN, T., HUHTINEN, M., KATILA, T. **Sperm-induced leukocytosis in the**

equine uterus. Theriogenology, v. 41, n. 3, p. 629–36, 1994.

KOVACS, T.A.S.; MATOS NETO, A.; AKIMOTO, B.F.; TANNO, D.R.; FIGUEIREDO, L.M. AMARAL, L.M. **Ozonioterapia como adjuvante na clínica médica de bovinos.** VIII Encontro Internacional de Produção Científica, Maringá – PR, 2013. Anais... Maringá, CESUMAR, 2013.

KOZDROWSKI, R., SIKORA, M., BUCZKOWSKA, J., NOWAK, M., RA'S, A., DZIECIOŁ, M. **Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares.** Animal Reproduction Science. v.154, p.56–62, 2015.

KUEN, M.J. **Genetic, biochemical and structural studies of biogenesis of adhesive pill in bactéria.** Meth and Enzyme. v. 236, p. 282-306, 1994.

LANGE, S.S.; MULHOLLAND, S.; HONEYCUTT, M.E. **What Are the Net Benefits of Reducing the Ozone Standard to 65 ppb?** An Alternative Analysis. v. 15, n.8, p.1586, 2018.

LEBLANC, M.M. **Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare.** Reproduction in Domestic Animals, v.45. n.2. p.21-27. 2010.

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

LEBLANC, M.M., CAUSEY, R.C. **Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility.** Reprod. Domest. Anim. v.44, p.10–22, 2009.

LEBLANC, M.M., MAGSIG, J., STROMBERG, A.J. **Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometitis in chronically infertile mares.** Theriogenology. v. 68, p.403-412, 2007.

LEBLANC, M.M., MCKINNON, A.O. **Breeding the problem mare.** In: MCKINNON A.O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. Equine Reproduction, Second Edition. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.

LEDEA, O.; Ph. D. **Thesis**, National Center for Scientific Research, Havana City, 2003.

LEITE, R. M. V. B. C.; CASTRO, C.; BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, F. A.; CARVALHO, C. G. P.; OLIVEIRA, A.C.B. **Indicações para o cultivo de girassol nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Roraima** – Comunicado técnico n. 78, EMBRAPA Londrina PR fevereiro, 2007.

LIU, I.K.M. **The diagnosis, causes and treatment of persistent endometritis in the mare.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.35, n.2, p.256-261, 2011.

LONCAR, K.D., FERRIS, R.R., MCCUE, P., BORLEE, B.R., HENNET, M.L., BORLEE, G.I. **In vitro efficacy of non-antibiotic agents against bacterial biofilm from equine uterine isolates.** In: Proceedings of the 61st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Las Vegas, Nevada, USA, p.458-459, 2015.

MACKAY, R.J. **Inflammation in horses.** Vet. Clin. North Am. Equine Prac. v.16, n.1, p.15-27, 2000.

MADEJ, P.; PLEWKA, A.; MADEJ, J.A.; NOWAK, M.; PLEWKA, D.; GRZEGORZ, F.; GOLKA, D. **Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems.** Inflammation. v.1, n.2, p.8-52, 2007.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock.** 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MALSCHITZKY, E. et al. **Endometrite na égua, novos conceitos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 1, p. 17–26, 2007.

MALSCHITZKY, E., SCHILELA, A., MATTOS, A.L.G., GARBADE, P., GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. **Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares.** Theriogenology, v.58, p.495-498, 2002.

MALSCHITZKY, E., SCHILELA, A., MATTOS, A.L.G., GARBADE, P., GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. **Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares.** Theriogenology, v.58, p.495-498, 2002.

- MANRIQUE, E.I., GALVÃO, L.L. **Racionalização e controle de antimicrobianos.** In: Rodrigues E. et al. Infecções hospitalares: prevenção e controle. São Paulo: Sarvier, 1996.
- MARTH, C.D. et al. **Deep sequencing of the uterine immune response to bacteria during the equine oestrous cycle.** BMC Genomics, v. 16, n. 1, p. 934, 2015.
- MARTINS, F.C., PIMENTEL, A.C. **Resposta endometrial de éguas submetidas à infusão uterina com querosene e iodo povidine.** ARS Veterinária, v.22, n.1, p. 70-79, 2006.
- MATOS NETO, A.; TIBURCIO, M.; OLIVEIRA, M.S. et al. **O uso do ozônio no tratamento de ferida incisa, suja contaminada e profunda (relato de caso).** In: ABRAVEQ, 2012, Campinas: +Equina, 2012.
- MATTOS, R., CASTILHO, L.F.F., MALSCHITZKY, E., KELLER, A., GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. **Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis.** Pferdeheilkunde, v.13, p.521-524, 1997.
- MELLO TP. et al. **Assessment of biofilm formation by *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*.** Biofouling. v.32, n.7, p.737-749, 2016.
- MENDONÇA, V.H. **Variação da concentração de marcadores inflamatórios em lavados uterinos de éguas com endometrite naturalmente acometida.** 2016. 72f. (Doutorado em Ciência Animal) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba – SP, 2016.
- MERHI, Z.; GARG, B.; LARUE-MOSELEY, R.; MOSELEY, A.R.; SMITH, A.H.; ZHANG, J. **Ozone therapy: a potential therapeutic adjunct for improving female reproductive health.** Medical Gas Research. v.9, n.2, p.101-105, 2019.
- MONTECHIESI, D.F.; IGNÁCIO, F.S. **Ozonioterapia local para tratamento de infecção uterina em éguas.** ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP, v.34, n.4 (Suplemento), 141-167, 2018.
- MONTEIRO, A.T., TONGU, E.A., SEGABINAZZI, L.G.T.M., ALVARENGA, M.A.

Plasma rico em plaquetas uma nova alternativa para o tratamento da endometrite fúngica. Revista Brasileira de Medicina + Equina, n.81, 2019.

MOREIRA, L.V.; MORETTI, A.B.F.; LIMA, C.J.; ANDREANE-KOZUSNY, D.I.; ZÂNGARO, R.A. RODRIGUEZ, Z.Z. **Efeitos da aplicação intra-mamária no tratamento de mastite em bovinos utilizando a ozonioterapia.** In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, Uberlândia – MG, 2014. Anais... Uberlândia, CBEB, p. 2143-2146, 2014.

MUSTAFA MG. **Biochemical basis of ozone toxicity.** Free Radic Biol Med. v.9, n.3, p. 65-245, 1990.

NASR, R.A., ABUSHADADY, H.M., HUSSEIN, S.H. **Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci.** The Egyptian Journal of Medical Human Genetics, vol. 13, p.269–274, 2012.

NIE, G.J., JOHNSON, K.E., WENZEL, J.G., BRADEN, W.T.D. **Effect of periovulatory ecbolics on luteal function and fertility.** Theriogenology. v.58, p.461-463, 2002.

NOVELLO, G., MARTINS, G.V., FRANÇA, R.T., BANDEIRA, R.S., PAULETTI, G.F., DELAMARE, A.P.L. LISBOA, F.P. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida* sp. isolada do útero de égua.** Rev. Acad. Ciênc. Anim. v.15, 2017.

O'TOOLE, G., KAPLAN, H.B., KOLTER, R. **Biofilm formation as microbial development.** Annual Review Microbiology. v. 54, p.49-79, 2000.

OGATA, A.; NAGAHATA, H. **Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows.** Journal of Veterinary Medical Science, Tokyo, v. 62, n. 7, p. 681- 686, 2000.

OLIVEIRA, I.B., PEIXOTO, R.M., SILVA, D.R., PINHEIRO JÚNIOR, J.W., OLIVEIRA, A.A.F., MOTA, R.A. **Análise comparativa entre o exame citológico e microbiológico no diagnóstico de endometrite equina.** Vet e Zootec. v.17, n.1, p. 43-46, 2010.

OLSEN, J.E., CHRISTENSEN, H., AARESTRUP, F.M. **Diversity and evolution of**

blaZ from Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.57, p.450–460, 2006.

OUF, S.A.; MOUSSA, T.A.; ABD-ELMEGEED, A.M.; ELTAHLAWY, S.R. **Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes.** Braz. J. Microbiol. v.47, p.1–13, 2016.

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.

PASOLINI, M.P., PRETE, C.D., FABBRI, S., AULETTA, L. **Endometritis and Infertility in the Mare – The Challenge in Equine Breeding Industry–A Review.** In Genital Infections and Infertility p.285–328, 2016.

PAVÃO, G.D.A. **Utilização de células tronco mesenquimais autólogas para o tratamento de éguas com endometrite crônica degenerativa.** 2013. 99f (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2013.

PERKINS, N.R. **Equine Reproductive Pharmacology.** Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, vol.15, pp. 687–704, 1999.

PETERSEN, M.R.; SKIVE, B.; CHRISTOFFERSEN, M.; LU, K.; NIELSEN, J.M. TROEDSSON, M.H.T. **Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus in mares with subclinical endometritis.** Veterinary Microbiology, v.179, p.119-125, 2015.

POLAT, B.; CENGİZ, M.; ÇOLAK, A.; CANNAZIK, O. **Comparison of Intrauterine Ozone and Rifaximine Treatment in Cows with Subclinical Endometritis.** Kafkas Univ Vet Fak Derg. v.21 n.5, p.773-776, 2015.

PYCOCK, J.F. **Breeding Management of the Problem Mare.** In J. C. Samper (Ed.), Equine Breeding Management and Artificial Insemination (139–164). St Louis, CA: Saunders Elsevier. 2009.

PYORALA, S., TAPONEN, J., KATILA, T. **Use of antimicrobials in the treatment**

of reproductive diseases in cattle and horses. *Reproduction in Domestic Animals*, v.49, n.3, p.16-26, 2014.

RE, L.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; BORDICCHIA, M.; MALCANGI, G.; POCOGNOLI, A.; MORALES-SEGURA, M.A.; ROTHCHILD, J.; ROJAS, A. **Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/ EpRE activation pathway *in vivo*? A preliminary result.** *Eur. J. Pharmacol.* v.742, p.158–162, 2014.

RE, L.; MAWSOUF, M.N.; MENÉNDEZ, S.; LEÓN, O.S.; SÁNCHEZ, G.M.; HERNÁNDEZ, F. **Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential.** *Arch. Med. Res.* v.39, p.17–26, 2008.

REGHINI, M.F.S., NETO, C.R., FARRÁS, M.C., FIORATTI, E.G., ALVARENGA, M.A. **Resposta inflamatória uterina após inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite.** *Vet. e Zootec.* v.2, n.21, p. 314-323, 2014.

REGHINI, M.F.S., RAMIRES NETO C., SEGABINAZZI, L.G., CASTRO CHAVES, M.M., DELL'AQUA, C.P., BUSSIERE, M.C., DELL'AQUA, J.A., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. **Inflammatory Response in Chronic Degenerative Endometritis Mares Treated with Platelet-Rich Plasma.** *Theriogenology.* Na International Journal of Animal Reproduction. 2016.

REIS, R.W.; PINTO, V.; AREND, T.C.; MALSCHTZKY, E.; PIPER, M. **Ozonioterapia no tratamento para Pitiose em equinos.** XVIII Fórum de pesquisa científica e tecnológica, Canoas – RS, 2018. Anais... EXPOULBRA, 2018.

REYES, M., LUND, T., LENVIK, T., AGUIAR, D., KOODIE, L., VERFAILLIE, C.M. **Purification and *ex-vivo* expansion of post-natal human marrow mesodermal progenitor cells.** *Blood.* v.12, p. 2615-2625, 2001.

RIBAS, J.A., CARVALHO, E.Q., STUSSI, J.P. **Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas.** *R. bras. Ci. Vet.* v. 21, n. 3, p. 204-212, 2014.

RIDDLE, W.T., LEBLANC, M.M., STROMBERG, A.J. **Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice.** *Theriogenology.* v. 68, n.3, p.395-402, 2007.

RIFA, D. E.; MUSA, Q. J. V. **Ozonoterapia intraarticular en la enfermedad artrósica de rodilla**. Rev Cubana Ortop Traumatol, Havana, v. 19, n. 1, 2005.

RODRÍGUEZ, J.F.L., MENÉNDEZ, J.L.M. **Resistencia a los antimicrobianos y virulência bacteriana**. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. v.23, n.2, p.86-93, 2005.

ROMEIRAS, M.I.B. **Abordagem da Endometrite num centro de reprodução equina: presença de fluido uterino como parâmetro indicador da inflamação**. 2017. 113f. (Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) Universidade de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, 2017.

SALIMENA, A.P.S. **Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina**. CES REVISTA, v. 28, n. 1, p. 88-102, 2014.

SATURNO, R.S.; GALDINO JÚNIOR, L.; OLIVEIRA, Y.K.C.; PESSOA, C.V. **Propriedade cicatrizante do óleo de girassol (*Helianthus annuus L.*): uma revisão de literatura**. Mostra Científica da Farmácia, 10., 2016, Quixadá. Anais... Quixadá: Centro Universitário Católica de Quixadá, 2016.

SCHWARTZ, A; KONTORSCHIKOVA, C. N.; MALESNIKOV, O. V.; SÁNCHEZ, G. M.; RE, L.; GRIBKOVA, I. A. **Guía para el uso médico del ozono - Fundamentos terapêuticos e indicaciones**. 1ª ed. Madrid: Artes Gráficas, 2011.

SCIORSI, R.L.; LILLO, E.; OCCHIOGROSSO, A.R. **Ozone therapy in veterinary medicine: A review**. Research in Veterinary Science. v.130, p. 240–246, 2020.

SCOGGIN, C.F. **Endometritis nontraditional therapies**. Vet. Clin. Equine. v.32, p. 499-511, 2016.

SERIO, F.; PIZZOLANTE, G.; COZZOLINO, G.; D'ALBA, M.; BAGORDO, F.; DE GIORGI, M.; DONNO, A. **A new formulation based on Ozonated sunflower seed oil: *in vitro* antibacterial and safety evaluation**. Ozone: Science & Engineering, v.39, p.139–147, 2017.

SINISCALCO, D.; TROTTA, M.C.; BRIGIDA, A.L.; MAISTO, R.; LUONGO, M.; FERRARACCIO, F.; D'AMICO, M.; DI FILIPPO, C. **Intraperitoneal administration**

of oxygen/ozone to rats reduces the pancreatic damage induced by streptozotocin. Biology (Basel) v.7, p.1–13, 2018.

SOARES, C.M.T. **Avaliação Ginecológica de éguas receptoras de embrião via diferentes métodos de diagnósticos.** 2017. 89f. (Dissertação de Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2017.

SPADEA, L.; TONTI, E.; SPATERNA, A.; MARCHEGIANI, A. **Use of ozone-based eye drops: a series of cases in veterinary and human spontaneous ocular pathologies.** Case Rep. Ophthalmol. v.9, p.287–298, 2018.

SRIKANTH, A.; SATHISH, M.; SRI HARSHA, A.V. **Aplicação do ozônio no tratamento da doença periodontal.** J Pharm Bioall Sci, 2013 Disponível em: <http://www.jpbonline.org/text.asp?2013/5/5/89/113304>. Acesso em: 15 de julho de 2020.

STANGE, C.; SIDHU, J.P.S.; TOZE, S.; TIEHM, A. **Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment.** Int. J. Hyg. Environ. Health. v.222, p.541–548, 2019.

SZPONDER, T.; WESSELY-SZPONDER, J.; SMOLIRA, A. **Evaluation of platelet-rich plasma and neutrophil antimicrobial extract as two autologous blood-derived agents.** Tissue Eng. Regen. Med. 14, 287–296, 2017.

TEIXEIRA, L.R. et al. **Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy.** Journal of Veterinary Medical Science, v.197, p.794-799, 2013.

THÄNERT, R., GOLDMANN, O., BEINEKE, A., MEDINA, E. **Host-inherent variability influences the transcriptional response of *Staphylococcus aureus* during *in vivo* infection.** Nature Communications, p.1-3, 2017.

THOMASSIAN A. **Enfermidade dos cavalos.** 4. ed. Varela, São Paulo–SP, p. 258-259, 2007.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRALDI, R.F. **Uso da ozonioterapia como terapia complementar em cães diagnosticados com Parvovirose.** 2019. 49F. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2019.

TROEDSSON, M.H.T. **Breeding-induced endometritis in mares.** Vet. Clin. North Am. Equine Pract. v.22, n.3, p.705-712, 2006.

TROEDSSON, M.H.T. **Endometritis.** In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. Equine Reproduction, Second Edition. U.K: Wiley- Blackwell; 2011.

TROEDSSON, M.H.T. **Uterine Clearance and resistance to persistent endometritis in the mare.** Theriogenology, v.52, n.3, p.461-471, 1999.

TROEDSSON, M.H.T., LIU, I.K.M. **Thurmond M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: Phagocytosis and Chemotaxis.** Biology of Reproduction. n. 49, p.507-514, 1993.

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

ÜNA, N., ASKAR, S., MACUN, H.C., SAKARYA, F., ALTUN, B., YILDIRIM, M. **Panton-valentine leukocidin and some exotoxins of Staphylococcus aureus and antimicrobial susceptibility profile of staphylococci isolated from milks of small ruminants.** Tropical Animal Health and Production, v.44, p.573-579, 2012.

VARGAS, H., CARNEIRO, G.F., SILVA FILHO, A.B., NASCIMENTO JUNIOR J.A.A. **Identificação de endometrite subclínica em éguas doadoras de embriões.** Revista Acadêmica Ciência Animal, v.1, p.281-282, 2019.

VARGAS, H., NASCIMENTO JUNIOR, J.A.A., MACIEL JÚNIOR, G.N., OLIVEIRA, E.R.G., OLIVEIRA, P., FERNANDES, I., OLIVEIRA, V., CARNEIRO, G.F., CORREIA, M.T. **Natural Products Derivatives are able to biofilm breakage in**

vitro of bacteria isolated from mare uterus. Anais do Congresso Latinoamericano de Microbiologia. v.1, p. 222, 2019.

VARGAS, H., NASCIMENTO JUNIOR, J.A.A., SOBRAL, G.G., VIANA, A.R., VILAR, I.J., CARNEIRO, G.F. **Intrauterine infusion of Ozone in susceptible mare.** Animal Reproduction (No prelo, 2019).

VAZ, E.K. **Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura.** Acta Scientiae Veterinariae. v.37, p.147-150, 2009.

VELANO, H. E. et al. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*.** Pesquisa Odontológica Brasileira, v.15, n.1, p. 18-22, 2001.

VENDRUSCOLO, C.P. **Avaliação dos efeitos inflamatórios do ozônio medicinal em articulações sinoviais de equinos hígidos.** 2017. 93F. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, São Paulo, 2017.

VIANA, F.A.B. **Guia terapêutico veterinário.** 3º ed. Lagoa Santa – MG. Gráfica e Editora CEM, 2014.

VIEBAHN-HANSLER, R.; LEON FERNANDEZ, O.S.; FAHMY, Z. **Ozone in medicine: the lowdose ozone concept—Guidelines and treatment strategies.** Ozone-Sci. Eng. v.34, p.408–424, 2012.

VIGLINO, G.C. **Ozonoterapia aplicada a equinos.** In: CONFERENCIA, 2008, Vale do Paraíba.

WANG, L.; CHEN, Z.; LIU, Y.; DU, Y.; LIU, X. **Ozone oxidative postconditioning inhibits oxidative stress and apoptosis in renal ischemia and reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway.** Drug Des. Devel. Ther. v.12, p.1293–1301, 2018.

WOLF, C.A., MASLCHITZKY, E., GREGORY, R.M., JOBIM, M.I.M., MATTOS, R.C. **Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis.** Theriogenology, vol.77, p.

1351– 1359, 2012.

WOODWARD, E.M. et al. **Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis.** Reproduction, v. 145, n. 3, p. 289–296, 2013.

WOODWARD, E.M., CHRISTOFFERSEN, M., CAMPOS, J., SQUIRES, E., TROEDSSON, M.H.T. **Susceptibility to persistent breeding induced endometritis: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons.** Theriogenology. v.78, p.495-50, 2012.

WOODWARD, E.M., TROEDSSON, M.M. **Inflammatory mechanisms of endometritis.** Equine Vet. J. n.4, v.47, p. 384-389, 2015.

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

ZOBEL, R. **Endometritis in simmental cowa: incidence, causes, and therapy options.** Turk J Vet Anim Sci. v.37, p.134-140, 2013.

ZOBEL, R.; TKALCIC, S. **Efficacy of Ozone and Other Treatment Modalities for Retained Placenta in Dairy Cows.** Reprod Dom Anim. v.48, p.121–125, 2013.

ZOBEL, R.; TKALCIC, S.; STOKOVIC, I.; PIPAL, I.; BUIC, V. **Efficacy of Ozone as a Novel Treatment Option for Urovagina in Dairy Cows.** Reprod Dom Anim. v.47, p.293–298, 2012.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a eficiência do óleo de girassol ozonizado na quebra de biofilme produzido *in vitro* por bactérias isoladas do útero de éguas susceptíveis.

4.2 ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar os principais microrganismos causadores de endometrite nos animais avaliados;
- Avaliar a taxa de resistência *in vitro* das bactérias isoladas;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos microrganismos isolados;
- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Bactericida Mínima (MBC) do óleo de Girassol Ozonizado para as bactérias isoladas.

CAPÍTULO I

PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE SENSIBILIDADE/RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS

(Formatação e layout da página, bem como normas de escrita, estão de acordo com a Revista Brasileira de Reprodução Animal, a qual o artigo será submetido. Salvo as posições das tabelas e figuras).

Perfil microbiológico e de resistência antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas do útero de éguas suscetíveis à endometrite

Microbiological and antimicrobial resistance profile in vitro of bacteria isolated from the uterus of mares susceptible to endometritis

Antonio Brito da Silva Filho¹, Laís Querino Barbosa Freire², Wisley da Silva Moraes², Illanna Brandão¹, Tuane Nunes Batista², Marcelo Mendonça², Elizabete Rodrigues da Silva², Gustavo Ferrer Carneiro¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil; ²Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, UFAPE, Garanhuns-PE.

Autor para correspondência: antoniobrito.vet@gmail.com

Resumo

Objetivou-se avaliar os principais microrganismos isolados do útero de éguas suscetíveis e o perfil de resistência a agentes antimicrobianos *in vitro* das bactérias. Foram coletadas amostras de 41 éguas com histórico de subfertilidade. Para cultura bacteriana as amostras foram armazenadas em tubos contendo caldo BHI e para cultura fúngica contendo Solução de NaCl a 0,9% e encaminhadas para o LABRAPE-UFRPE. As bactérias isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade *in vitro* para Amicacina, Gentamicina, Enrofloxacina, Azitromicina, Ceftriaxona, Tetraciclina, Penicilina e Ampicilina. 75,6% das amostras apresentaram isolamento microbiológico, sendo 25,8% *Staphylococcus* spp.; 12,9% bacilos Gram-negativos não fermentadores de lactose; 3,22% *Streptococcus* β -hemolítico; 3,22% *E. coli*; 3,22% *Klebsiella* spp. e 3,22% *Proteus* spp.; 22,6% *Bacillus* spp. e 6,45% *Micrococcus* spp. Dentre as amostras isoladas para fungos 6,45% foram *Cladosporium* spp. Observou-se que 12,9% dos animais apresentaram infecção mista. 95,23% das bactérias foram sensíveis para Amicacina; 90,47% para Gentamicina, Enrofloxacina, Tetraciclina e Ceftriaxona e 80,95% para Azitromicina. Penicilina apresentou 95,24% das amostras resistentes, com 100% das bactérias Gram-negativas e 70% para Ampicilina. A endometrite bacteriana foi a mais prevalente. A presença de infecção fúngica reforça a capacidade desses microrganismos em desenvolver endometrite. Os macrolídeos mostraram-se efetivos e os β -Lactâmicos ineficazes contra bactérias Gram-negativas.

Palavras chaves: útero, antibiograma, fungos, equinos.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the main microorganisms isolated from the uterus of susceptible mares and the resistance profile to antimicrobial agents *in vitro* of the bacteria. Samples were collected from 41 mares with a history of subfertility. For bacterial culture the samples were stored in tubes containing BHI broth and for fungal culture containing 0.9% NaCl solution and sent to LABRAPE-UFRPE. The isolated bacteria were subjected to the *in vitro* sensitivity test for Amikacin, Gentamicin, Enrofloxacin, Azithromycin, Ceftriaxone, Tetracycline, Penicillin and Ampicillin. 75.6% of the samples presented microbiological isolation, being 25.8% *Staphylococcus* spp.; 12.9% non-lactose-fermenting Gram-negative bacilli; 3.22% β -hemolytic streptococcus; 3.22% *E. coli*; 3.22% *Klebsiella* spp. and 3.22% *Proteus* spp.; 22.6% *Bacillus* spp. and 6.45% *Micrococcus* spp. Among the isolated samples for fungi 6.45% were *Cladosporium* spp. It was observed that 12.9% of the animals had mixed infection. 95.23% of the bacteria were sensitive to Amikacin; 90.47% for Gentamicin, Enrofloxacin, Tetracycline and Ceftriaxone and 80.95% for Azithromycin. Penicillin showed 95.24% of resistant samples, with 100% of Gram-negative bacteria and 70% for Ampicillin. Bacterial endometritis was the most prevalent. The presence of fungal infection reinforces the ability of these microorganisms to develop endometritis. Macrolides were effective and β -Lactamics were not viable against Gram-negative bacteria.

Keywords: uterus, antibiogram, fungi, horses.

Introdução

Dentre as enfermidades que acometem o sistema reprodutivo das fêmeas equinas, a endometrite é considerada uma das mais importantes, pois as alterações causadas no endométrio uterino devido ao

processo infeccioso e inflamatório levam à incapacidade de concepção, morte embrionária precoce e encurtamento da fase lútea, exercendo impacto econômico significativo (Diel de Amorim et al., 2015), já que os animais afetados apresentam ciclo estral irregular, requerem manejo intensivo e exigem maior número de ciclos estrais para a obtenção de um produto viável, resultando no incremento dos custos de produção (Thomassian, 2007).

A endometrite pode apresentar diversas classificações, de acordo com sua causa, tais como: endometrite persistente pós-cobertura; endometrite crônica; endometrite subclínica; piometra; metrite aguda pós-parto; e endometrite venérea (Katila, 2016). Na maioria das vezes, a endometrite infecciosa apresenta origem bacteriana, sendo as bactérias *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, mais identificadas nas culturas microbiológicas (Riddle et al., 2007; Troedsson, 2011). Outras bactérias aeróbias isoladas do útero de éguas incluem *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Actinobacter* spp., *Proteus* spp., e *Citrobacter* spp. (Troedsson, 2011). Todavia, fungos leveduriformes e filamentosos, são potencialmente patogênicos para o endométrio das éguas (Ghasemzadehnavi et al., 2004; LeBlanc, 2008). Sendo *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. os microrganismos mais comumente isolados (Coutinho da Silva; Alvarenga, 2011).

Há uma constante variação nas espécies de bactérias isoladas, assim como na susceptibilidade aos antibióticos que podem variar de uma população para outra e entre diferentes regiões. Uma antibioticoterapia inadequada pode resultar em falhas no tratamento e consequentemente perdas econômicas (Pyorala et. al., 2014). Pode levar ainda a uma resistência antimicrobiana, fator de preocupação mundial. Embora não se conheça exatamente o mecanismo, o uso repetitivo, prolongado e excessivo de antimicrobianos aparentemente está associado ao aumento da incidência de endometrites fúngicas (Liu, 2011). Segundo Coutinho da Silva e Alvarenga (2011) o refluxo de antibióticos e desinfetantes usados repetidas vezes em tratamentos uterinos podem levar a uma alteração da microbiota vaginal criando um ambiente propício para o desenvolvimento de agentes patogênicos.

Um dos fatores mais importantes para permitir a sobrevivência dos microrganismos em condições adversas é a resistência antimicrobiana, através desta foram selecionadas características pelas quais as bactérias tornaram-se capazes de escapar da ação dos fármacos. Com o passar das décadas, essa resistência sofreu um aumento considerável, estabelecendo-se como uma das principais preocupações em saúde pública (Kuen, 1994).

Na medicina veterinária, o uso intensivo de antimicrobianos pode resultar na seleção de bactérias resistentes, tornando a ação dos princípios ativos menos eficazes (Vaz, 2009) e permitindo que bactérias patogênicas se adaptem ao ambiente competitivo. A associação de fatores de virulência e resistência a antibióticos são importantes mecanismos necessários para sobrevivência das bactérias sob condições adversas (Beceiro, et al., 2013). Desta forma, o objetivo desse trabalho foi traçar um perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos a partir de isolados bacterianos de útero de éguas suscetíveis.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de 41 éguas de raças e idades diversas, com histórico de coleta de embrião ou prenhez negativa por três vezes consecutivas, provenientes de propriedades localizadas na região Agreste do estado de Pernambuco, durante a estação de monta de 2019. As coletas foram realizadas com o uso de coletores comerciais do tipo escova citológica (CCE). O uso de animais neste experimento foi previamente autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) de acordo com o protocolo 23082.008142/2019-76.

Após o esvaziamento do reto com auxílio de luva de palpação transretal, as regiões perianal e perivaginal foram devidamente higienizadas com Clorexidina 2%. Posteriormente, o coletor comercial tipo escova citológica duplamente guardada (PROVAR®) foi introduzido protegido com a mão. A penetração da escova citológica foi realizada através da cérvix com auxílio do dedo, seguido de rompimento da primeira proteção plástica, e exposição do conjunto coletor, já introduzido no útero de forma transcervical. Com o conjunto coletor dentro do útero, o lacre externo foi rompido, permitindo o contato da escova citológica com a parede interna do útero, sendo realizados suaves movimentos rotatórios. Depois de colhida a amostra, puxou-se a haste interna de volta para dentro do tubo externo e após retirar todo o conjunto de dentro do útero às amostras foram encaminhadas para uma bancada estéril. Com o auxílio de uma chama proveniente de um Bico de Bunsen, foi realizado um esfregão em lâmina estéril para citologia e posteriormente um swab estéril foi esfregado na escova citológica para obtenção de uma alíquota da amostra para cultivo fúngico. As amostras para cultura bacteriana foram armazenadas em tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável, estéreis contendo meio BHI Caldo (Brain Heart Infusion). As amostras para cultivo fúngico foram armazenadas em tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável estéreis, contendo Solução de NaCl a 0,9%. Ambas as amostras de cada égua foram

devidamente identificadas e acondicionadas dentro de uma caixa de transporte de isopor sob refrigeração e encaminhadas para o Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE) da UFRPE-UAG para as análises de cultivo e identificação bacteriana e fúngica, assim como realização dos testes de sensibilidade antimicrobiana.

No laboratório, as amostras em caldo BHI foram incubadas em estufa sobre aerobiose a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Já as amostras em Solução de NaCl a 0,9% foram semeadas em placas contendo Ágar Saubouroud Dextrose 4% e posteriormente incubados em estufa em aerobiose a $\pm 29^{\circ}\text{C}$, por 7 dias. O crescimento fúngico foi avaliado a cada 24 horas. Após as 24 horas de incubação das amostras para cultura bacteriana, as mesmas foram semeadas em placas contendo Agar Sangue de Carneiro 6% (v/v) e Agar Maconkey e posteriormente incubadas novamente em estufa sobre aerobiose na temperatura de $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas. Após o período de incubação foram avaliadas as características de crescimento das colônias nas placas, como produção de hemólise, pigmento e características morfológicas e foram confeccionadas lâminas pelo método de coloração Gram de acordo com Quinn et al. (1994), para diferenciação entre cocos e bacilos Gram positivos ou Gram negativos, sendo ambos posteriormente submetidos à prova da Catalase.

Para identificação das enterobactérias foram utilizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de urease, Caldo Nitrato, teste de VM/VP (VM - reação de Vermelho de Metila; VP - reação de Voges- Proskauer), teste em Ágar SIM (S - produção de H_2S ; I - produção de Indol; M - motilidade) e teste em Ágar Citrato (utilização do carbono do citrato) e então identificadas de acordo com a metodologia empregada por Carter (1988) e Quinn et al. (1994). Para identificação dos cocos Gram-positivos catalase positivas, foram utilizados os seguintes testes: Teste da Bacitracina e Novobiocina, Coagulase e CAMP-teste, de acordo com a ANVISA (2004). Para identificação morfológica dos fungos, foram observados os aspectos macro e micromorfológicos das estruturas somáticas e reprodutivas, comparando os resultados com base na literatura específica (Ellis, 1971; Ellis, 1976; Sutton, 1980; Domsh et al., 2007).

Os testes de sensibilidade/resistência antimicrobiana *in vitro* das bactérias isoladas foram realizados utilizando a técnica de difusão em disco em Mueller Hinton, segundo o CLSI (2008), sendo testadas as seguintes drogas: Amicacina, Gentamicina, Enrofloxacin, Azitromicina, Ceftriaxona, Tetraciclina, Penicilina e Ampicilina para as bactérias Gram-negativas. Os isolados foram reativados em caldo BHI, incubados a 37°C , durante 16-18 h. As culturas foram diluídas em caldo BHI para 10^5 UFC. mL^{-1} , de acordo com a escala de MacFarland, plaqueadas em ágar Mueller Hinton e incubadas as enterobactérias a 37°C e os *Staphylococcus* spp. a 35°C , durante 24h. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e o resultado comparado com o padrão do CLSI. Os resultados obtidos foram analisados através da análise descritiva, utilizando o software Microsoft EXCEL 2010, onde foram estabelecidas as frequências absolutas e relativas dos dados encontrados.

Resultados

No presente trabalho foi observado que 75,6% das éguas apresentaram isolamento microbiológico positivo. A frequência de microrganismos isolados é apresentado na Tabela 1. Dentre os isolamentos microbiológicos positivos, 25,8% das amostras foram identificadas como *Staphylococcus* spp.; 12,9% para bacilos Gram-negativos não fermentadores de lactose; 3,22% para *Streptococcus* β -hemolítico; 3,22% para *E. coli*; 3,22% para *Klebsiella* spp. e 3,22% para *Proteus* spp. além disso, 22,6% das amostras apresentaram crescimento de bactérias do gênero *Bacillus* spp. e 6,45% *Micrococcus* spp. Dentre as amostras isoladas para fungos 6,45% foram positivas para *Cladosporium* spp. Também foi observado que em 12,9% das amostras houve a presença de infecção mista, quando há o envolvimento de mais de um microrganismo, sendo uma amostra positiva para *Klebsiella* spp. e *E. coli*, uma para *Staphylococcus* spp. e *Penicilium* spp., uma para *Staphylococcus* spp. e *Cladosporium* spp. e uma para *Klebsiella* spp. e *Trichosporum* spp.

Em relação ao perfil de sensibilidade aos antibióticos testados foi observado que 95,23% das amostras apresentaram sensibilidade para Amicacina; 90,47% para Gentamicina, Enrofloxacin, Tetraciclina e Ceftriaxona e 80,95% para Azitromicina. Em relação ao perfil de resistência (Figura 1) a Penicilina apresentou 95,24% das amostras resistentes, com 100% das bactérias Gram-negativas resistentes e 70% dessas amostras foram resistentes para Ampicilina.

Discussão

Das 41 éguas coletadas, 75,6% apresentaram culturas microbiológicas positivas, valor um pouco superior ao encontrado por Oliveira et al. (2010) que obtiveram 64% das amostras positivas em um estudo

realizado com éguas da mesma região deste estudo, e mais próximo de Benko et al. (2015) que observaram 69,7% de positividade em amostras coletadas do útero de 437 éguas PSI e semelhantes aos encontrados por Cabrera et al. (2016) que encontraram isolamento microbiológico em 71,4% das 196 éguas coletadas.

Em relação à frequência de bactérias isoladas, o presente estudo apresentou maior frequência de isolamento para as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. seguido por bacilos Gram-negativos não fermentadores de lactose, *Streptococcus* β -hemolítico, *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. Resultados que vão de acordo com os encontrados por Cabrera et al. (2016) que observaram maior frequência (47,1%) de isolados para bactérias do gênero *Staphylococcus*. Em contrapartida, esses resultados diferem dos encontrados por Câmara et al. (2013) em que *E. coli* foi a bactéria com maior prevalência, correspondendo a 53,33%. No entanto, esse percentual de isolamento de *E. coli*, foi observado em amostras de animais clinicamente sadios e que não apresentaram citologia positiva, o que de acordo com Leblanc e Causey (2009), pode representar contaminação das amostras, pois amostras de éguas com culturas positivas, associadas a citologia negativa e ausência de sinais clínicos, deve-se considerar a possibilidade de contaminação.

Já Benko et al. (2015) observaram que os *Streptococcus* β -hemolíticos, em um estudo com éguas Puro Sangue Inglês, foram mais prevalentes, correspondendo a 40,4% das amostras e as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. corresponderam a 17,7% das 307 amostras consideradas positivas. No entanto, o autor não descreveram se as éguas em que foram coletadas as amostras apresentavam algum histórico de subfertilidade ou sintomatologia de endometrite, tendo em vista, que a pesquisa foi feita em cima de avaliações ginecológicas de rotina em uma central de garanhões PSI.

No presente estudo também foi observado o isolamento de 22,6% (7/31) das amostras para bactéria do gênero *Bacillus* spp. e 6,45% (2/31) para *Micrococcus* spp. De acordo com Riddle et al. (2017), *Bacillus* spp. e *Micrococcus* spp. são microrganismos comensais da pele e mucosa do trato urogenital, o que pode levar a diagnósticos falsos positivos devido a contaminação das amostras (Buczowska et al., 2014; Cadario, 2014). Porém, deve-se levar em consideração que em determinados casos as bactérias podem se fixarem na forma de biofilme nas dobras endometriais do útero levando ao desenvolvimento de endometrites subclínicas crônicas (Ferris, 2017).

Observou-se ainda que 12,9% (4/31) das culturas apresentaram contaminação mista, ou seja, quando mais de um microrganismo estão envolvidos, dentre elas 1/31 foi positivo para *Klebsiella* spp. e *E. coli*; 1/31 para *Staphylococcus* spp. e *Penicillium* spp.; 1/31 para *Staphylococcus* spp. e *Cladosporium* spp. e 1/31 para os gêneros *Klebsiella* e *Trichosporon*. Oliveira et al. (2007) e Oliveira et al. (2010) também encontraram infecções mistas em 16,6% e 10,9% dos isolados microbiológicos respectivamente, sendo estas ocorridas por bactérias. Ainda de acordo com os mesmos autores as infecções mistas podem agravar as lesões no endométrio, além dificultar o tratamento devido à variação de sensibilidade ao antimicrobiano utilizado que pode ocorrer. Poucos estudos descrevem as infecções mistas entre fungos e bactérias em útero de éguas, porém de acordo com Frontoso et al. (2008) como as bactérias que ocasionam as endometrites são essencialmente contaminantes e oportunistas, infecções mistas entre fungos e bactérias também podem ocorrer. Ribas et al. (2014) em estudo realizado com 84 éguas, observaram a prevalência de 2,35% de infecções mistas entre fungos e bactérias, sendo a *Candida* spp. o agente fúngico isolado.

Além disso, 6,45% (2/31) foram positivas exclusivamente para contaminação fúngica, sendo o *Cladosporium* spp. o gênero isolado. Estudos realizados por Amaral et al. (2007), mostram que os fungos filamentosos do gênero *Cladosporium* spp. apresentam uma alta correlação com processos inflamatórios crônicos do útero de éguas, chegando a uma prevalência de 75% dos isolados para esse fungo relacionados a processos inflamatórios, perdendo apenas para os fungos do gênero *Aspergillus* spp. Batista et al., (2008) demonstram a prevalência de 60% de casos de endometrite fúngica, causada por *Candida* sp. em culturas microbiológicas de éguas oriundas da Zona da Mata de Pernambuco. Assim como, Ribas et al. (2014) demonstraram resultados com prevalência de 20,8% de endometrite fúngica, sendo *Candida* sp. o fungo mais prevalente, houve também incidência de fungos filamentosos como o *Trichosporon penicillatum*.

O que difere deste trabalho, onde o agente com maior prevalência de isolamento foi o *Cladosporium* spp. o que pode ser justificado pelo fato de que este agente, além de ser um dos mais prevalentes na microbiota vaginal de éguas sadias (Azarvandi et al. 2017), o que pode justificar o seu desenvolvimento como microrganismo oportunista, também é considerado um dos fungos mais facilmente isolados do ambiente, além de fazer parte da microbiota natural da pele de humanos, e que dependendo da espécie associada, pode apresentar um alto grau de patogenicidade em tecidos devido a sua capacidade de digerir proteínas (Menezes et al. 2017), o que pode levar a uma endometrite iatrogênica, devido a alta capacidade de contaminação de materiais e instrumentos por parte dos esporos desse fungo, como também, a falta de cuidados e higiene por parte dos veterinários.

Em relação ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (Figura 1) 95,23% das amostras apresentaram sensibilidade para Amicacina; 90,47% para Gentamicina, Enrofloxacina, Tetraciclina e Ceftriaxona e 80,95% para Azitromicina. Cabrera et al. (2016) encontraram índices de maior sensibilidade para Enrofloxacina (93%), no entanto, também observaram resultados expressivos de sensibilidade para Amicacina (73%). Já Bandeira et al. (2017) apresentaram índices de sensibilidade para Amicacina de 89%, seguido de Enrofloxacina 76%, Gentamicina 72,7%, Ceftriaxona 71%.

Em relação ao perfil de resistência aos antimicrobianos (Figura 2) a Penicilina apresentou 95,24% das amostras resistentes, com 100% das bactérias Gram-negativas resistentes, das quais 70% foram resistentes para Ampicilina. Resultados esses semelhantes aos encontrados por Oliveira et al. (2007) que também encontraram 100% de resistência a Penicilina das amostras testadas. Bandeira et al. (2017) demonstram que resistência para Ampicilina de 77%, o que vai de acordo com os resultados encontrados neste estudo, no entanto, para Penicilina, o perfil de resistência foi de 64%. Entretanto, Cabrera et al. (2016) apontaram em seus estudos um baixo índice de sensibilidade para a Penicilina e Ampicilina de 2,9% e 10% respectivamente, levando a compreender que 97,1% das amostras foram resistentes ou intermediárias para a Penicilina e 90% para Ampicilina.

O alto índice de resistência aos β -Lactâmicos como Penicilina e Ampicilina pode ocorrer devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos no combate a diferentes enfermidades o que leva à seleção de cepas resistentes prejudicando a eficácia do tratamento com essas drogas (Haveri et al. 2005). Existem poucos dados estatísticos na literatura a respeito da quantidade de fármacos utilizados pela medicina veterinária, no entanto, estima-se que 70% desses medicamentos sejam antibióticos (Thiele-Bruhn, 2003; Díaz-Cruz e Barceló, 2007). Estatísticas europeias apontam o uso de aproximadamente 4,6 milhões de kg de antibióticos destinados a produção animal, sendo as Tetraciclins, os β -Lactâmicos e as Cefalosporinas os produtos mais utilizados

Já na reprodução animal, principalmente em casos de endometrite é comum o uso de diversos antibióticos, tais como Ceftiofur, Gentamicina, Ticarcilina com Ácido Clavulânico, Ampicilina, Penicilinas, Amicacina e Tetraciclins (Dascanio, 2011) através de infusões intrauterinas (LeBlanc e Causey, 2009). No entanto, a grande maioria desses fármacos com exceção da Amicacina, não apresentam indicação para uso tópico intrauterino (Viana, 2014). Fato importante, pois atualmente sabe-se que a principal fonte de resistência antimicrobiana, não está ligada a capacidade residual do fármaco, mas sim ao uso indiscriminado de antibióticos no que diz respeito a doses e vias de administrações (Sales, 2015).

A resistência antimicrobiana, ocorre quando os microrganismos adquirem genes de resistência aos antibióticos através de mutação gênica ou como consequência da aquisição destes genes de outros microrganismos já resistentes. Neste último caso, os genes de resistência podem estar presentes em plasmídeos que contêm outros genes que permitem sua seleção em ambientes nos quais haja a presença seletiva de antimicrobianos (Rodríguez e Menéndez, 2005).

Nos casos de microrganismos resistentes a drogas que fazem parte do grupo dos β -Lactâmicos, como é o caso dos dados encontrados neste estudo, os mesmos possuem genes conhecidos como genes “*bla*” podendo ser encontrados tanto em plasmídeos, como no cromossomo das bactérias, os mesmo são responsáveis por codificarem a síntese da enzima β -lactamase. Essa enzima pode ser encontrada no espaço periplasmático e impede que o antibiótico entre na célula através da hidrólise do anel β -Lactâmico, estrutura presente nas drogas que fazem parte desse grupo, os quais são responsáveis por ligarem-se as Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBP) que são enzimas bacterianas atuantes no processo de transpeptidação durante a biossíntese da parede celular (Olsen et al. 2006; Andrade, et al 2016).

Conclusões

Pode-se concluir que a endometrite bacteriana foi a mais prevalente neste estudo, os Macrolídeos se mostraram efetivos contra os agentes testados e os β -Lactâmicos inviáveis principalmente para endometrites causadas por bactérias Gram-negativas. No entanto, a presença de infecção fúngica reforça a capacidade desses microrganismos em desenvolver endometrite.

Referências

Amaral MG, Pimentel MM, Fiala SM, Schramm EG, Xavier e Mendonça M. Endometrite equina: fungos e bactérias. Arch. Zootec. n. 56, v.216, p.875-884, 2007.

Andrade LN, Darini ALC. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?. J. Infect Control, Brazil, v.6, n.1, p.16-25, 2017.

ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/microbiologia/mod_5_2004.pdf> Acesso em: 12 de junho de 2019.

Azarvandi A, Talebkhan GM, Khosravi A, Hosseini A, Gharagozloo F. Isolation and identification of molds flora in external genital tract of healthy mares. Journal of Veterinary Research. n.1, v.72, p.103-110, 2017.

Bandeira RS, Thomasini J, Lorenzet G, Martins GV, Novello G, França, RT Lisboa, F. Avaliação microbiológica e teste de sensibilidade in vitro de bactérias isoladas do útero de éguas da raça Crioula. Rev. Acad. Ciênc. Anim. v.15, n.1, p.127-128, 2017.

Batista IO, Oliveira AAF, Pinheiro Júnior JW, Peixoto RM, Teles JAA, Mota RA. Endometrite por *Candida* sp. e outros microrganismos associados em éguas doadoras de embrião na Zona da Mata do Estado de Pernambuco – Brasil. Medicina Veterinária, v. 2, n. 4, p. 41-44, 2008.

Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clinical Microbiology Reviews. v.26, p.185-230, 2013.

Benko TM, Boldizar FN, Hura V, Karamanova M, Petrovic V. Incidence of bacterial pathogens in equine uterine swabs, their antibiotic resistance patterns, and selected reproductive indices in English thoroughbred mares during the foal heat cycle. Medicina Veterinaria, v.60, n.11, p. 613-620, 2015.

Buczowska J, Kozdrowski R, Nowak M, Raś A, Staroniewicz Z, Siemieniuch MJ. Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. Reproductive Biology and Endocrinology, v. 12, p. 27, 2014.

Cabrera T, Patorelo M, Alvarenga MA. Prevalência e perfil de sensibilidade bacteriana em éguas com endometrite. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13, n.23, p. 1013, 2016.

Cadario, M. Revisiting the diagnosis and the treatment options for an old problem: chronic and post-breeding endometritis in the mare. The Practitioner, v.1, p. 21–25, 2014.

Câmara WM, Cancimansi JAN, Shimoda E, Fagundes B, Barreto MAP, SILVA JFS. Identificação e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isolada de éguas suspeitas ou não de endometrite. Rev. Bras. Ciênc. Agrár. v.8, n.4, p.669-674, 2013.

Carter GR. Fundamentos da bacteriologia e micologia veterinária. São Paulo: Roca, p.249, 1988.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, M31-A3, v.28, n.8, 2008.

Coutinho da Silva MA, Alvarenga MA. Fungal endometritis in mares. Equine Reproduction. p.2532-2538, 2011.

Dascanio J. How and When to Treat Endometritis With Systemic or Local Antibiotics. AAEP Proceedings, v.57, p. 24–31, 2011.

Díaz-cruz MS, Barceló D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. Trac-Trends Anal. Chem. v.26, p. 637-646, 2007.

Diel de Amorim M, Gartley CJ, Foster RA, Hill A, Scholtz EL, Hayes A, Chenier TS. Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of Equine Endometritis. Journal of Equine Veterinary Science, v.44, p.54-61, 2015.

Domsch KH, Gams W, Anderson TH. Compendium of soil fungi. Eching: IHW189, Verlag, p.672, 2007.

Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 1971.

Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 1976.

Ferris, RA. Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. Rev. Bras. Reprod. Anim. v.41, n.1, p.74-80, 2017.

Frontoso R, De Carlo E, Pasolini MP, Van Der Meulen K, Pagnini U, Iovane G, De Martino L. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. Res. Vet. Sci., v. 84, p. 1-6, 2008.

Ghasemzadesnava H. et al. A review of mare endometritis in Iran. J. Equine Vet. Sci. v.24, n.5, p.188-192, 2004.

Haveri M, Suominen S, Rantala L, Honkanen-Buzalski T, Pyörälä S. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. Veterinary Microbiology. v.106, p.97–102, 2005.

Katila T. Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. Reproductive Biology. v. 198, p. 8, 2016.

Kuen MJ. Genetic, biochemical and structural studies of biogenesis of adhesive pill in bacteria. Meth and Enzyme. v. 236, p. 282-306, 1994.

Leblanc MM. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. Theriogenology. v.70 p.421–429,

2008.

Leblanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod. Domest. Anim.* v.44, p.10–22, 2009.

Liu, IKM. The diagnosis, causes and treatment of persistent endometritis in the mare. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.2, p.256-261, 2011.

Menezes CP, Pérez ALAL, Lima EO. *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. *Acta Brasiliensis*. n.1, p.23-27, 2017.

Oliveira IB, Peixoto RM, Silva DR, Pinheiro Junior JW, Oliveira AAF, Mota RA. Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias aeróbias isoladas de éguas suspeitas de endometrite procedentes do Estado de Pernambuco. *Medicina Veterinária, Recife*, v.1, n.1, p.19-25, 2007.

Oliveira IB, Peixoto RM, Silva DR, Pinheiro Júnior JW, Oliveira, AAF, Mota RA. Análise comparativa entre o exame citológico e microbiológico no diagnóstico de endometrite equina. *Vet e Zootec.* v.17, n.1, p. 43-46, 2010.

Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *staphylococci*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.57, p.450–460, 2006.

Pyorala S, Taponen J, Katila T. Use of antimicrobials in the treatment of reproductive diseases in cattle and horses. *Reproduction in Domestic Animals*, v.49, n.3, p.16-26, 2014.

Quinn PJ et al. *Clinical Veterinary Microbiology*, London: Wolfe, 1994. 648p

Ribas JA, Carvalho EQ, Stussi JP. Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas. *R. bras. Ci. Vet.* v. 21, n. 3, p. 204-212, 2014.

Riddle WT, Leblanc MM, Stromberg AJ. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice: *Theriogenology*, v.68, n.3, p.395-402, 2007.

Riddle WT, Leblanc MM, Stromberg AJ. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*. v. 68, n.3, p.395-402, 2007.

Rodríguez JFL, Menéndez JLM. Resistencia a los antimicrobianos y virulência bacteriana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* v.23, n.2, p.86-93, 2005.

Sales RL, Rocha JLM, Bressan J. Utilização de hormônios e antibióticos em produtos de origem animal: aspectos gerais e toxicológicos. *Nutrire.* n. 40, v. 3, p.409-420, 2015.

Sutton BC. The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. *Commonwealth Mycological Institute*, p.96, 1980.

Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 166:145-167, 2003.

Thomassian A. *Enfermidade dos cavalos*. 4. ed. Varela, São Paulo–SP, p. 258-259, 2007

Troedsson MHT. Endometritis. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. *Equine Reproduction*, Second Edition. U.K: Wiley- Blackwell; 2011.

Vaz EK. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.37, p.147-150, 2009.

Viana FAB. *Guia terapêutico veterinário*. 3º ed. Lagoa Santa – MG. Gráfica e Editora CEM, 2014

Ilustrações

Tabela 1. Frequências absoluta e relativa de microrganismos isolados por cultura microbiológica do útero de éguas da região do Agreste Pernambucano na estação de monta de 2019.

Microrganismos isolados	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
<i>Staphylococcus</i> spp.	8	25,80%
Bacilos Gram negativos NFL	4	12,90%
<i>Streptococcus</i> β -hemolítico	1	3,22%
<i>Escherichia coli</i>	1	3,22%
<i>Klebsiella</i> spp.	1	3,22%
<i>Proteus</i> spp.	1	3,22%
<i>Cladosporium</i> spp.	2	6,45%
<i>Klebsiella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i>	1	3,22%
<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Penicilium</i> spp	1	3,22%
<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Cladosporium</i> spp.	1	3,22%
<i>Klebsiella</i> spp. e <i>Trichosporon</i> spp.	1	3,22%
<i>Bacillus</i> spp.	7	22,60%
<i>Micrococcus</i> spp.	2	6,49%
Total	31	100%

*NFL – Não Fermentadores de Lactose

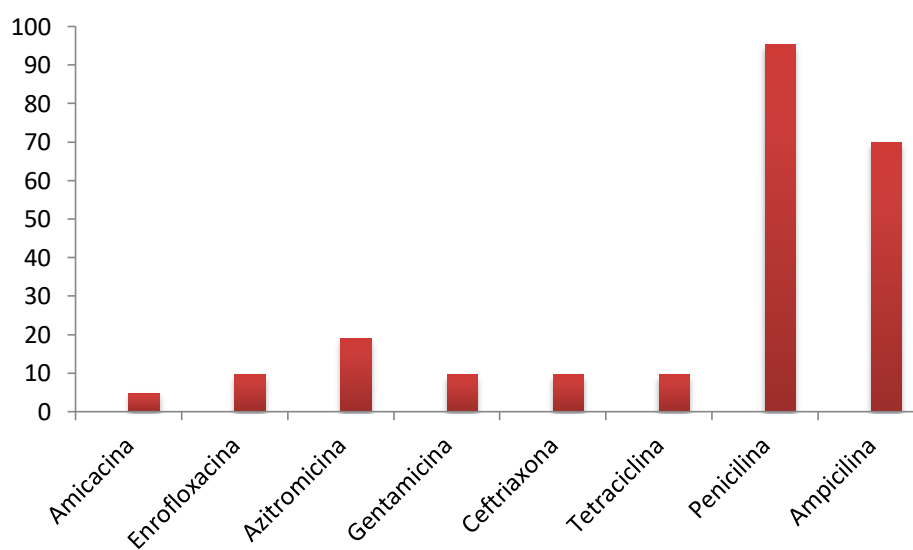


Figura 1. Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas do útero de éguas suscetíveis localizadas no Agreste de Pernambuco.

CAPÍTULO II

AÇÃO ANTIBIOFILME DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO FRENTE A BACTÉRIAS ISOLADAS DO ÚTERO DE ÉGUAS SUSCETÍVEIS À ENDOMETRITE

(Formatação e layout da página, bem como normas de escrita, estão de acordo com o Journal “Theriogenology”, a qual o artigo será submetido. Salvo as exceções do idioma e posição das tabelas e figuras).

Ação antibiofilme do óleo de girassol ozonizado frente a bactérias isoladas do útero de éguas susceptíveis à endometrite

A.B. da Silva Filho¹, L.Q.B. Freire², W.S. Moraes², I. Brandão¹, T.N. Batista², M. Mendonça², E.R. Silva², G.F. Carneiro^{1*}

^{1*} Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, PE, Brasil; ² Universidade Federal do Agreste de Pernambuco – UFAPE, Garanhuns, PE, Brasil

Resumo

O objetivo desse estudo foi caracterizar a ação antibiofilme do óleo de girassol enriquecido com ozônio (O₃) frente a patógenos associados a endometrite em éguas. Inicialmente, amostras de 41 éguas com histórico de subfertilidade foram armazenadas em caldo BHI e em solução NaCl a 0,9%. As amostras foram submetidas à cultura e identificação microbiana e ao teste de sensibilidade *in vitro* no LABRAPE-UFRPE, BR. A produção de biofilme foi avaliada pelo método de cristal violeta. Finalmente, bactérias formadoras de biofilme foram submetidas à ação de diferentes concentrações de óleo de girassol ozonizado. Dos 21 isolados submetidos à produção de biofilme 76,2% (16/21) apresentaram produção positiva, sendo 43,75% (7/16) fracas produtoras; 43,75% (7/16) moderadas produtoras e 12,5% (2/16) fortes produtoras, com uma média de massa de biofilme de 0,145 (0,328±0,066) para os cocos Gram-positivos e 0,155 (0,307±0,077) para os bacilos Gram-negativos. Após a ação do Óleo de Girassol Ozonizado na concentração de 203,43 mEq/L foi observada redução na massa de biofilme dos bacilos Gram-negativos para 0,109 (0,054 ± 0,210). Pode-se concluir que o

Óleo de Girassol Ozonizado apresentou resultados satisfatórios na quebra de biofilme de bactérias Gram-negativas.

Palavras-chave: Ozônio; Endometrite; Peróxido; Reprodução; Equinos.

1. Introdução

Dentre as enfermidades que acometem o sistema reprodutivo das fêmeas equinas, a endometrite é considerada uma das mais importantes [1,2,3,4,5,6,]. As alterações causadas no endométrio uterino devido ao processo infeccioso e inflamatório levam à incapacidade de concepção, morte embrionária precoce e encurtamento da fase lútea [7]. Os animais afetados apresentam ciclo estral irregular, requerem manejo intensivo e exigem maior número de ciclos estrais para a obtenção de um produto viável, resultando no incremento dos custos de produção [8].

Tem-se relatado que em infecções uterinas crônicas em éguas que não apresentam sucesso com o tratamento à base de atibioticoterapia, existe uma correlção positiva com isolados bacterianos capazes de produzir biofilme *in vitro* [9]. O biofilme consiste em uma matriz de polissacarídeos sintetizados por comunidades microbianas em uma superfície biótica ou abiótica [10], impedindo a ação dos antibióticos sobre as mesmas [11]. A formação de biofilme no trato reprodutivo equino é teorizada como uma causa significativa de endometrite crônica na égua [9].

A utilização do O₃ como terapia teve início há mais de 150 anos, [12]. Quando foi usado pela primeira vez como uma molécula microbicida em 1856 e posteriormente em 1860, para esterilizar salas de cirurgias e sistemas de tratamento de água, respectivamente [13]. Durante o século passado vários estudos revelaram suas funções antioxidantes e antiinflamatórias e seu efeito imunoestimulador, com efeitos colaterais mínimos [12].

A reação do ozônio com óleos vegetais tais como o óleo de girassol, ocorre quase exclusivamente com as duplas ligações entre carbonos presentes nos ácidos graxos insaturados [14]. Essa reação produz vários compostos oxigenados, como hidroperóxidos, ozonetos, aldeídos, peróxidos, diperóxidos e poliperóxidos [15]. Esses compostos oxigenados são responsáveis pela ampla atividade biológica dos óleos vegetais ozonizados. O rendimento dos compostos oxigenados a partir de óleos insaturados do tipo de meio em que a reação ocorre, presença de aditivos, da

temperatura da reação, do tipo de reator, da agitação da mistura de reação e as doses de ozônio aplicadas [15].

Até o momento não há registros na literatura que correlacione a ação do óleos ozonizados com a quebra da massa de biofilme a partir de isolados bacterianos. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência do óleo de girassol ozonizado na quebra de biofilme produzido *in vitro* por bactérias isoladas do útero de éguas susceptíveis.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

O experimento utilizou 41 éguas de diferentes raças e idades, com coletas de embrião ou prenhez negativa por três vezes consecutivas, provenientes de propriedades localizadas na Região Agreste do estado de Pernambuco, durante a estação de monta de 2019. O uso de animais neste experimento foi previamente autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) de acordo com o protocolo 23082.008142/2019-76.

Os animais foram avaliados clinicamente, com o intuito de se obter sinais de endometrite persistente, direcionando o exame para a avaliação ginecológica que consistiu na observação da conformação vulvar, coaptação dos lábios vulvares, presença de secreção vulvar e palpação seguida de ultrassonografia transretal para determinação do tamanho, simetria, presença ou ausência de conteúdo, consistência e tubularidade do útero e das características dos ovários.

2.2. Coleta das amostras

Após o esvaziamento do reto com auxílio de luva de palpação transretal, as regiões perianal e perivaginal foram devidamente higienizadas com Clorexidina 2%. Posteriormente, o coletor comercial tipo escova citológica duplamente guardada (PROVAR®) foi introduzido protegido com a mão. A penetração da escova citológica

foi realizada através da cérvix com auxílio do dedo, seguido de rompimento da primeira proteção plástica, e exposição do conjunto coletor, já introduzido no útero de forma transcervical. Com o conjunto coletor dentro do útero, o lacre externo foi rompido, permitindo o contato da escova citológica com a parede interna do útero, sendo realizados suaves movimentos rotatórios. Depois de colhida a amostra, puxou-se a haste interna de volta para dentro do tubo externo e após retirar todo o conjunto de dentro do útero às amostras foram encaminhadas para uma bancada estéril. Com o auxílio de uma chama proveniente de um Bico de Bunsen, foi realizado um esfregaço em lâmina estéril para citologia e posteriormente um *swab* estéril foi esfregado na escova citológica para obtenção de uma alíquota da amostra para cultivo fúngico. As amostras para cultura bacteriana foram armazenadas em tubos de ensaio de vidro estéreis contendo meio BHI Caldo (Brain Heart Infusion). As amostras para cultivo fúngico foram armazenadas em tubos de ensaio de vidro estéreis, contendo Solução de NaCl a 0,9%. Ambas as amostras de cada égua foram devidamente identificadas e acondicionadas dentro de uma caixa de transporte de isopor sob refrigeração e encaminhadas para o Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE) da UFRPE-UAG para as análises de cultivo e identificação bacteriana e fúngica, avaliação da formação de biofilme, determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) do óleo de girasol ozonizado, bem como, a ação do mesmo sobre o biofilme bacteriano.

2.3 Identificação bacteriana e fúngica

As amostras em caldo BHI foram incubadas em estufa sob aerobiose a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e as amostras em Solução de NaCl a 0,9% foram semeadas em placas contendo Ágar Saubourod Dextrose 4% e posteriormente incubados em estufa em aerobiose a $\pm 29^{\circ}\text{C}$. O crescimento fúngico foi avaliado a cada 24 horas durante sete

dias. Após as 24 horas de incubação das amostras para cultura bacteriana, as mesmas foram semeadas em placas contendo Agar Sangue de Carneiro 6% (v/v) e Agar MacConkey e posteriormente incubadas novamente em estufa sobre aerobiose na temperatura de $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas. Após o período de incubação foram avaliadas as características de crescimento das colônias nas placas, como produção de hemólise, pigmento e características morfológicas e foram confeccionadas lâminas pelo método de coloração Gram de acordo com Quinn et al. (1994) [16], para diferenciação entre cocos e bacilos Gram-positivos ou Gram-negativos, sendo ambos posteriormente submetidos a prova da Catalase.

Para identificação das enterobactérias (bacilos gram-negativos catalase negativa) foram utilizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de urease, Caldo Nitrato, teste de VM/VP (VM - reação de Vermelho de Metila; VP - reação de Voges-Proskauer), teste em Ágar SIM (S - produção de H_2S ; I - produção de Indol; M - motilidade) e teste em Ágar Citrato (utilização do carbono do citrato) e então identificadas de acordo com a metodologia empregada por Carter (1988) [17] e Quinn et al. (1994) [16]. Para identificação dos cocos Gram-positivos catalase positivos, foram utilizados os seguintes testes: Teste da Bacitracina e Novobiocina, Coagulase e CAMP-teste, de acordo com a ANVISA (2004) [18]. Para identificação morfológica dos fungos, foram observados os aspectos macro e micromorfológicos das estruturas somáticas e reprodutivas, comparando os resultados com base na literatura específica [19,20,21,22].

2.4 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do Óleo de Girassol Ozonizado

A concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) do óleo de girassol ozonizado foram determinadas pelo método de microdiluição, conforme descrito pelas diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) [23], com algumas modificações, usando caldo Mueller-Hinton com 0,5% de Tween 80. O Tween 80 foi utilizado para facilitar a diluição do óleo de girassol ozonizado no caldo Mueller-Hinton, tendo em vista que o mesmo é um meio líquido. Para tanto, foi utilizado óleo de girassol ozonizado, com o índice de peróxido de 406,87 mEq/kg. Resumidamente, uma alíquota de 1ml da suspensão de cada isolado bacteriano ajustado para a $DO_{600} = 0,5$ foi distribuída em cinco tubos de microcoagulação estéreis, posteriormente 1ml do óleo de girassol ozonizado foi adicionado em cada tubo microcoagulação de vidro para cada isolado bacteriano em concentrações variando de 12,71 a 203,43 mEq de peróxido, homogeneizando o óleo com o meio a cada diluição e após a inoculação as amostras foram incubadas a 37°C por 24 h sob agitação. Sendo considerada MIC a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, e MBC a menor concentração capaz de inibir 99,9% das bactérias em 24 horas. Para determinar a MBC, cada tubo do MIC foi semeado em placas com Plate Count Agar (PCA), sendo realizada contagem bacteriana após incubação a 37°C por 24 horas. Para controle negativo, utilizou-se o óleo de girassol ozonizado caldo Mueller-Hinton com 0,5% de Tween 80 mais o óleo de girassol ozonizado nas mesmas diluições.

2.5 Quantificação da formação de biofilme

Para quantificação da formação de biofilme bacteriano, foi utilizada a técnica do Cristal Violeta, seguindo recomendações descrito por Darwish e Asfour et al. (2013) [24] e Melo et al. (2013) [25]. Onde resumidamente 3 colônias de cada isolado bacteriano, foram inoculadas em 3 ml de TSB glicosado e incubadas a 37°C por 24

horas, posteriormente cada inóculo passou por uma diluição de 1:40 em TSB glicosado estéril e 200 µL da diluição de cada amostra foi utilizado para preencher poços de microplacas de poliestireno de 96 poços (CELLSTAR® Cell Culture Microplates, Greiner Bio-one, Alemanha) com 5 repetições para cada amostra. Após 24 h de incubação a 37°C, o meio foi descartado, as placas foram lavadas por três vezes com 250 µL com Solução Salina a 0,8% (p/v), e secas por inversão a 37°C por 1 hora. Logo após, 200 µL de metanol foi distribuído em cada poço para fixação do biofilme, desprezando o mesmo por inversão após 15 minutos em temperatura ambiente, para que só assim fosse distribuído 160 µL da Solução de Cristal Violeta 0,5% (p/v) em cada poço, desprezando após 1 minuto por inversão. As placas foram lavadas com água destilada, até remoção completa do corante e posteriormente foi adicionado 160 µL de etanol 95% em cada poço e desprezado imediatamente. As placas foram secas em temperatura ambiente e lidas em espectrofotômetro a 570 nm.

A interpretação dos resultados foi de acordo com os critérios sugeridos por Darwish e Asfour (2013) [24], onde após estabelecer o ponto de corte a partir da média aritmética e desvio padrão das densidades óticas (ODs) do controle negativo (ODc), a média aritmética das ODs das amostras testes (ODt) foi utilizada para classificar a amostra de acordo com as seguintes categorias: Não produtora de biofilme = $ODt \leq 0,071$; Fraca produtora = $0,071 < ODt \leq 0,141$; Produtora moderada = $0,141 < ODt \leq 0,282$; e Forte produtora de biofilme = $ODt > 0,282$.

1.3 Ação do óleo de girassol ozonizado na quebra de biofilme bacteriano

As bactérias que foram capazes de produzir biofilme, foram novamente induzidas a esta produção como descrito acima. Após 24 horas de incubação o conteúdo líquido da placa foi removido e foi adicionado em cinco poços para cada amostra 200 µL da

solução de óleo de girassol ozonizado contendo TSB glicosado mais 0,5% de Tween 80, para se obter a concentração de 203,43 mEq de peroxide. Para controle negativo o mesmo procedimento foi realizado em outra placa e após a indução de produção de biofilme foi adicionado 200 µL de óleo de girassol extravirgem. Posteriormente, as placas foram incubadas por mais 24 horas a 37°C sob agitação e após esse período, os poços foram corados com cristal violeta a 0,5% e depois de secas, as placas foram lidas em espectrofotometro a 570 nm.

2.4. *Análise Estatística*

Os resultados obtidos foram analisados através da análise descritiva, utilizando o software Microsoft EXCEL 2010, onde foram estabelecidas as frequências, medias, máximas e mínimas dos dados obtidos.

2. Resultados

No presente trabalho foi observado que 75,6% das éguas apresentaram isolamento microbiológico positivo, enquanto 24,4% das amostras foram negativas. Em relação à frequência de microrganismos isolados (Figura 1) 25,8% (8/31) das amostras foram positivas para *Staphylococcus* spp.; 12,9% (4/31) para bacilos Gram-negativos não fermentadores de lactose; 3,22% (1/31) para *Streptococcus* β-hemolítico; 3,22% (1/31) para *E. coli*; 3,22% (1/31) para *Klebsiella* spp. e 3,22% (1/31) para *Proteus* spp. Além disso 22,6% (7/31) das amostras apresentaram crescimento de bactérias do gênero *Bacillus* spp. e 6,45% (2/31) *Micrococcus* spp. Dentre as amostras isoladas para fungos 6,45% (2/31) foram positivas para *Cladosporium* spp. Também foi observado que em 12,9% (4/31) das amostras houve a presença de infecção mista, quando há o envolvimento de mais de um microrganismo, sendo uma amostra positiva para

Klebsiella spp. e *E. coli*, uma para *Staphylococcus* spp. e *Penicilium* spp., uma para *Staphylococcus* spp. e *Cladosporium* spp. e uma para *Klebsiella* spp. e *Trichosporum* spp.

A MIC e MBC do óleo de girassol ozonizado frente à patógenos associados a endometrite equina são apresentados na Tabela 1. Tanto para os cocos Gram-positivos como para a maioria dos bacilos Gram-negativos a MIC correspondeu a diluição de 101,71 mEq de peróxido, enquanto que a MBC foi de 203,43 mEq de peróxido, ou seja uma relação entre MIC e MBC de duas vezes maior. Apenas para o *Proteus* spp. que a MIC correspondeu a 50,85 mEq de peróxido, enquanto a MBC foi 4 vezes maior, correspondendo a 203,43 mEq de peróxido.

Para a capacidade de produção de biofilme, foi observado que dos 21 isolados submetidos à produção de biofilme 76,2% (16/21) apresentaram produção positiva, sendo 43,75% (7/16) fracas produtoras; 43,75% (7/16) moderadas produtoras e 12,5% (2/16) fortes produtoras (Figura 2) com uma média de massa de biofilme de 0,145 ($0,328 \pm 0,066$) para os cocos Gram-positivos e 0,155 ($0,307 \pm 0,077$) para os bacilos Gram-negativos.

Após a ação do óleo ozonizado sob o biofilme previamente formado, foi observado que das seis amostras de bacilos Gram-negativos testados apenas uma amostra, sendo esta do gênero *Klebsiella* spp. não apresentou alteração na formação de biofilme, enquanto as demais, apresentaram redução ou ausência de biofilme após o tratamento, o que correspondeu a uma redução na massa de biofilme para 0,109 ($0,210 \pm 0,054$). No entanto, para os cocos Gram-positivos 5 amostras não apresentaram alteração na massa de biofilme após tratamento, 3 amostras apresentaram redução na massa e 2 amostras apresentaram aumento de massa após o tratamento, o que correspondeu a um aumento de massa geral para 0,240 ($0,968 \pm 0,048$). Em relação aos

controles, tanto os bacilos Gram-negativos, como os cocos Gram-positivos, apresentaram aumento na massa de biofilme após exposição ao óleo de girassol extravirgem.

4. Discussão

Biofilmes referem-se a complexas comunidades sésseis de microorganismos que se encontram ligados a uma superfície ou firmemente encravados em uma matriz extracelular. A matriz que envolve as bactérias torna-as tolerantes a condições adversas e resistentes a tratamentos antibacterianos [26,10,27]. Neste trabalho, foi observado 75,6% das éguas apresentaram isolamento microbiológico positivo, enquanto 24,4% das amostras foram negativas. Oliveira et al (2010) [28] em trabalho realizado com rebanhos de éguas da região Agreste e Zona da Mata de Pernambuco, observaram que 64% das amostras foram positivas ao exame microbiológico e 36% negativas, no entanto, o número de animais avaliados foi menor que neste trabalho, com um total de 25 éguas. Já Cabrera et al. (2016) [29] observaram culturas positivas em 71.4% das 196 éguas coletadas, resultados mais próximos dos observados nesse estudo.

Foi observado neste estudo uma relação entre MIC e MBC de 2 vezes para a grande maioria das bactérias avaliadas, com exceção apenas do gênero *Proteus* spp. em que essa relação passou a ser de 4 vezes maior do MIC para o MBC. Estudos realizados por Díaz et al. (2006) [30] ao avaliarem as características físicoquímicas e microbiológicas do óleo de girassol e do óleo de oliva, observaram uma relação entre MIC e MBC 5 vezes maior para o *Staphylococcus aureus* e 2,3 vezes para *E. coli* utilizando óleo de girassol com concentrações de 862 mEq de peróxido/Kg. Neste mesmo estudo, ao avaliarem óleos com teor de peróxido de 2,506 mEq de peróxido/Kg, foi observado uma relação entre MIC e MBC de 11,7 vezes maior. O que demonstra

que quanto maior a concentração de peróxido em um óleo após ozonização, maior sua capacidade antimicrobiana. Fato que também justifica a diferença entre as razões encontradas por Díaz et al. (2006) [30] com as desse estudo, tendo em vista, que a concentração do óleo utilizado no nosso estudo foi de 406,87 mEq de peróxido/kg. Em relação a bactéria do gênero *Proteus* spp. que se mostrou mais sensível a diferentes concentrações do óleo ozonizado, não foi encontrado nenhum artigo na literatura consultada que justificasse este achado, no entanto, deve-se levar em consideração as características individuais de cada microrganismo frente a condições e agentes antimicrobianos, que pode variar entre indivíduos de um mesmo grupo, gênero e espécie.

Para a capacidade de produção de biofilme, foi observado que dos 21 isolados submetidos à produção de biofilme 76,2% (16/21) apresentaram produção positiva, sendo 37,5% (6/16) fracas produtoras; 50% (8/16) moderadas produtoras e 12,5% (2/16) fortes produtoras. Noel et al. (2016) [31] avaliando essa mesma capacidade a partir de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite de vacas com mastite, observaram resultados semelhantes, sendo 74,4% dos isolados positivos, em que 65% foram classificados como fortes produtores e 35% como fracos produtores, tendo variações de acordo com a espécie de *Staphylococcus* spp. envolvida. Em isolados de útero de éguas, Beehan et al. (2016) [32], ao avaliarem a capacidade de formação de biofilme de 56 amostras de *E. coli*, observaram que 31% das amostras foram consideradas forte produtoras, 8% moderadas produtoras e 61,5% fracas produtoras. A capacidade que determinado microrganismo possui para produzir biofilme, depende diretamente da aquisição de genes que conferem tal habilidade [33,34]. De acordo com Ferris et al. (2014) [35] há uma tendência ainda maior para aquisição desses genes, pois a capacidade de troca de material genético acelera quando as bactérias estão em um

estilo de vida de biofilme e isso permite a rápida transferência horizontal de material genético, tornando o biofilme um meio perfeito para o surgimento de novos patógenos por meio da aquisição de resistência a antibióticos, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência ambiental. Desta forma, pode-se supor que a avaliação da capacidade de formação de biofilme, está diretamente relacionada a virulência das comunidades bacterianas em rebanhos, onde os microrganismos demonstrem esta habilidade.

O óleo de girasol ozonizado na concentração de 203,43 mEq/L conseguiu atuar na redução da massa de biofilme apenas em bacilos Gram-negativos para 0,109 (0,054 $\pm$ 0,210) o que correspondeu uma redução média de 30% da massa de biofilme nessa população de bactéria, resultados superiores aos encontrados por Ferris et al. (2014) [35], que ao avaliarem a ação de agentes não antibióticos, dentre eles a solução salina ozonizada, observaram uma taxa de redução de biofilme de 6,19% para as massas formadas por *E. coli*; 1,42% para *Klebsiella pneumonia* e ausência de redução em massas formadas por *Pseudomonas aeruginosa*. A justificativa do autor para os resultados obtidos com o ozônio, é que a molécula do O₃ se dissipa facilmente em temperaturas ambientes e provavelmente o mesmo tenha se dissipado antes de ser exposto a bactéria em solução salina. No entanto, no processo de ozonização de óleos vegetais, como nesse caso o de girassol, o O₃ reage quase que exclusivamente com as duplas ligações entre os carbonos presentes nos ácidos graxos insaturados essa reação promove a formação do composto 1,2,3-trioxolano, o qual se decompõe rapidamente para um composto carbônico e um aldeído que se recombina para fornecer ozonetos, aldeídos, hidroxidroperóxidos e peróxidos [36]. Desta forma, quando associado com óleos, o ozônio é convertido em sua maioria em peróxidos, podendo ficar viáveis por longos períodos de tempo, mantendo as suas propriedades, fato este que justifica uma maior taxa de quebra de biofilme neste trabalho.

Também foi observado que o óleo de girassol ozonizado não demonstrou a mesma eficiência em biofilmes formados por bactérias Gram-positivas, onde 5 amostras não apresentaram alterações na massa de biofilme após exposição ao óleo e 2 amostras apresentaram aumento dessa massa. No entanto, já foi demonstrado que peptideoglicanos, principalmente o N-acetil-glicosamina, apresentam resistência ao ozônio em soluções com pH ácido-neutro [37]. Como essas moléculas são encontradas em maior quantidade na parede celular de bactérias Gram-positivas e dos capsídeos virais, pode-se justificar uma menor ação do ozônio sobre as mesmas. Em contra partida explica-se em parte, a menor resistência das Gram-negativas, que possuem uma parede celular menos rígida e com maior quantidade de lipoproteínas e lipopolissacarídeos [38]. O que pode facilitar a penetração do ozônio, principalmente quando o mesmo está em forma de peróxidos, associadas a óleos vegetais.

Em duas amostras de *Staphylococcus* spp, foi observado um crescimento na massa de biofilme após a exposição as amostras ao óleo ozonizado, esse fato pode ter ocorrido devido a presença do Tween 80, utilizado para provocar uma emulsificação do óleo de girassol ozonizado com o caldo Mueller-Hinton que é um meio líquido. Trabalhos realizados por Nielsen et al. (2016) [39], demonstraram que a adição de Tween 80 em cultivos de *S. aureus*, provocou aumento na taxa de crescimento das culturas, assim como aumentou a massa total de biofilme *in vitro*. Entretanto, esses autores relatam que o Tween 80 não teve efeito na taxa de crescimento de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens* e levou a formação de menos biofilme.

4. Conclusão

Pode-se concluir que bactérias isoladas a partir de amostras de útero de éguas suscetíveis à endometrite são capazes de produzir biofilme *in vitro*. O óleo de girassol

ozonizado com concentração de peróxido de 406,87 mEq/kg, pode inibir o crescimento bacteriano na contração de 101,71 mEq/kg de peróxido e destruir 99,9% das bactérias na concentração de 203,43 mEq/kg de peróxido. O óleo de girassol ozonizado na concentração de 203,43 mEq/kg de peróxido, demonstrou resultados satisfatórios na quebra de biofilme *in vitro* produzidos por bactérias Gram-negativas e mostrou-se pouco eficiente na quebra de massa de biofilme produzidas por bactérias Gram-positivas. A eficiência do óleo de girassol ozonizado está diretamente ligada a sua concentração de peróxido. São necessários mais estudos sobre os mecanismos de ação do óleo de girassol ozonizado sobre diferentes tipos de microrganismos e seus fatores de virulência.

Referências

- [1] Troedsson, MHT. Uterine Clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, v.52, n.3, p.461-471, 1999.
- [2] Causey, RC. et al. The equine immune response to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidermicus* during uterine infection. *Vet. J. London*, v.172, n.2, p.248-257, 2006.
- [3] Leblanc, MM, Magsig, J. Stromberg, AJ. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*. v. 68, p.403-412, 2007.
- [4] Overbeck, W, Witte, TS, Heuwieser, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*. v.75, p.1311–1318, 2011.
- [5] Woodward, EM. et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction*, v. 145, n. 3, p. 289–296, 2013.

- [6] Kozdrowski, R., Sikora, M., Buczkowska, J., Nowak, M., Ra's, A., Dziecioł, M. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. *Animal Reproduction Science*. v.154, p.56–62, 2015.
- [7] Thomassian A. *Enfermidade dos cavalos*. 4. ed. Varela, São Paulo–SP. 2007. 258-259.
- [8] Diel de Amorim, M, Gartley, CJ, Foster, RA, Hill, A, Scholtz, EL, Hayes, A, Chenier, TS. Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of Equine Endometritis. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2015. 44:54-61.
- [9] Vargas, H, Nascimento Junior, JAA, Maciel Júnior, GN, Oliveira, ERG, Oliveira, P, Fernandes, I, Oliveira, V, Carneiro, GF, Correia, MT. Natural Products Derivatives are able to biofilm breakge *in vitro* of bacteria isolated from mare uterus. *Anais... Congresso Latinoamericano de Microbiologia*. 2019.1:222.
- [10] Tortora, GJ, Funke, BR., Case, CL. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- [11] Ferris, RA. Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. *Rev. Bras. Reprod. Anim*. 2017. 41:1, p.74-80.
- [12] Elvis, AM, Ekta, JS. Ozonoterapia: Uma revisão clínica. *J Nat Sc Biol Med*. 2011. 2:66-70.
- [13] Merhi, Z, Garg, B, Larue-Moseley, R, Moseley, AR, Smith, AH, Zhang, J. Ozone therapy: a potential therapeutic adjunct for improving female reproductive health. *Medical Gas Research*. 2019. 9:2. p.101-105.
- [14] Bailey, P. *Ozonolysis of Olefins: Introduction, Initial Ozone Attack and Adduct; The Peroxides Products*. *Ozonization in Organic Chemistry*, Academic Press: New York, 1978.
- [15] Ledea, O.; Ph. D. Thesis, National Center for Scientific Research, Havana City, 2003.
- [16] Quinn PJ et al. *Clinical Veterinary Microbiology*, London: Wolfe, 1994. p.648.

- [17] Carter GR. Fundamentos da bacteriologia e micologia veterinária. São Paulo: Roca. 1988. p.249.
- [18] ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf> Acesso em: 12 de junho de 2019.
- [19] Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 1971.
- [20] Ellis MB. Dematiaceous Hyphomycetes. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 1976.
- [21] Sutton BC. The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. 1980. p.96.
- [22] Domsch KH, Gams W, Anderson TH. Compendium of soil fungi. Eching: IHW189, Verlag. 2007. p.672.
- [23] CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, M31-A3. 2008. 28:8.
- [24] Darwish, SF, Asfour, HAE. Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. The Scientific World Journal. 2013. 1-9.
- [25] Melo, PC, Ferreira, LM. Filho, AN, Zalafon, LF, Vicente, HIG, Souza, V. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n. 1, p. 119-124, 2013.
- [26] Madigan, MT et al. Microbiologia de Brock. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- [27] Salimena, APS. Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. CES REVISTA, v. 28, n. 1, p. 88-102, 2014.
- [28] Oliveira IB, Peixoto RM, Silva DR, Pinheiro Júnior JW, Oliveira, AAF, Mota RA. Análise comparativa entre o exame citológico e microbiológico no diagnóstico de endometrite equina. Vet e Zootec. 2010. 17(1):43-46.
- [29] Cabrera T, Patorelo M, Alvarenga MA. Prevalência e perfil de sensibilidade bacteriana em éguas com endometrite. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia. 2016. 13:1013.

- [30] Díaz, MF, Hernandez, R, Martinez, G, Vidal, G, Gómez, M, Fernández, H, Garcés, R. Comparative Study of Ozonized Olive Oil and Ozonized Sunflower Oil. J. Braz. Chem. 2006.17:2, p.403-407,
- [31] Noel, CC. et al. Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Produção de “Slime” de Isolados de *Staphylococcus spp.* Provenientes de casos de Mastite Bovina na Região Sul-Fluminense. Revista de Saúde. 2016. 07 (1): 22-26.
- [32] Beehan, DP, Wolfsdorf, K, Elam, J, Krekeler, N, Paccamonti, D. The Evaluation of Biofilm-Forming Potential of *Escherichia Coli* Collected From the Equine Female Reproductive Tract. J. Equine Vet. Sci. 2016. 35:935-39.
- [33] Nasr, RA, Abushadady, HM, Hussein, SH. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of *staphylococci*. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2012. 13:269–274.
- [34] O’Toole, G, Kaplan, HB, Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. Annual Review Microbiology. 2000. 54:49-79.
- [35] Ferris, RA, Wittstock, SM, Mccue, PM, Borlee, BR. Evaluation of biofilms in gram-negative bacteria isolated from the equine uterus. J Equine Vet Sci. 2014. 34:121.
- [36] Schwartz, A, Kontorschikova, CN, Malesnikov, OV, Sánchez, GM, RE, L, GRIBKOVA, I. A. Guía para el uso médico del ozono - Fundamentos terapêuticos e indicaciones. 1ª ed. Madrid: Artes Gráficas, 2011.
- [37] Perez, RR, Nunez, SA, Baluja, C, Otero, ML. Ozonation kinetics of glucosamine and N-acetyl glucosamine in aqueous medium. Ozone: Science & Engineering, 1995. 17:463-467.
- [38] Thanomsub, B, Anupunpisit, V, Chanphetch, S, Watcharachaipong, T, Poonkhum, R, Srisukonth, C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. Journal General Applied Microbiology. 2002. 48(4):193-199.
- [39] Nielsen, CK, Kjems, J, Mygind, T, Snabe, T, Meyer, RL. Efeitos do Tween 80 no crescimento e formação de biofilme em meios de laboratório. Frontiers in Microbiology. 2016. 7.

Legendas de figuras e tabelas:

Tabela 1

Suscetibilidade de bactérias isoladas do útero de éguas a diferentes concentrações de óleo de girassol ozonizado.

Tabela 2

Ação do Óleo de Girassol Ozonizado sobre o biofilme de bactérias isoladas do útero de éguas suscetíveis.

Figura 1

Frequência relativa de microrganismos isolados por cultura microbiológica do útero de éguas da região do Agreste Pernambucano na estação de monta de 2019.

Figura 2

Classificação das amostras de bactérias isoladas de útero de éguas suscetíveis quanto sua capacidade de produção de biofilme *in vitro*.

Tabela 1

Classe ou Gênero	MIC	MBC	MBC/MIC
Bacteriano	(mEq de Peróxido)	(mEq de Peróxido)	
Cocos gram-positivos			
<i>Staphylococcus</i> spp.	101,77	203,43	2
<i>Streptococcus</i> β -hemolítico			
Bacilos gram-negativos			
<i>E. coli</i>	102,77	203,43	2
<i>Klebsiella</i> spp.			
Bacilos Gram-negativos NFL			
<i>Proteus</i> spp.	50,85	203,43	4

*MIC – Concentração Inibitória Mínima; MBC – Concentração Inibitória Mínima; NFL – Não Fermentadores de Lactose.

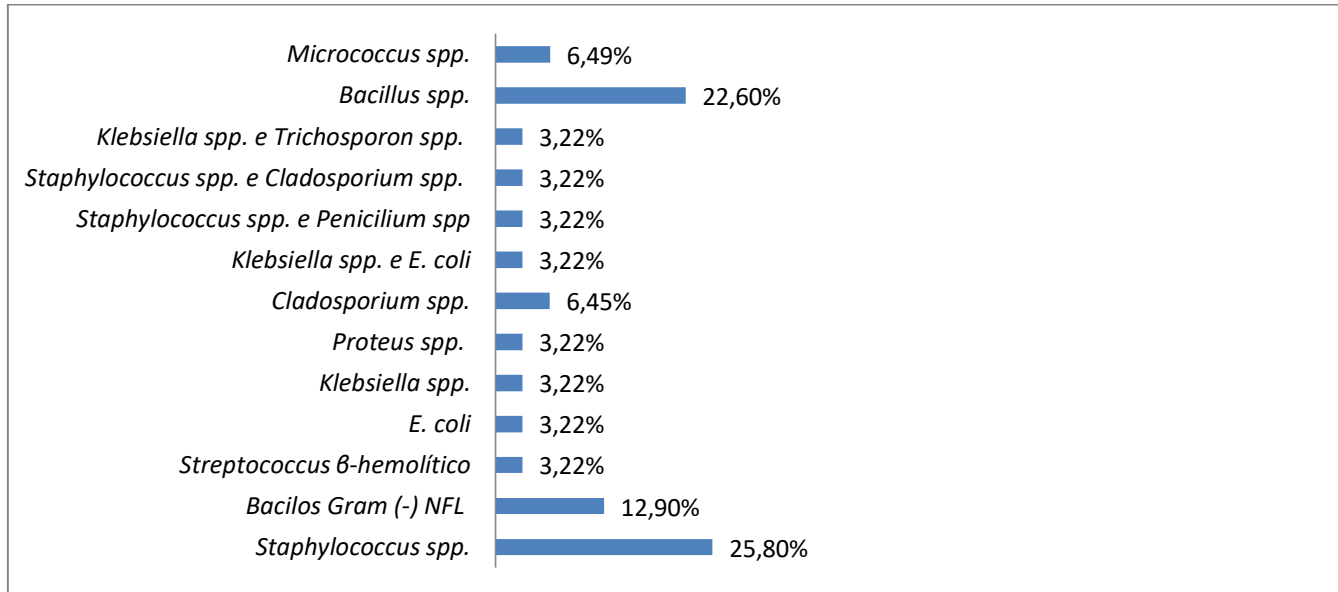
Tabela 2

Isolados	Biofilme Inicial		Bifilme após tratamento	
Cocos Gram-positivos				
Staphylococcus spp.	0,081	+	0,477	+++
Staphylococcus spp.	0,072	+	0,094	+
Staphylococcus spp.	0,073	+	0,085	+
Staphylococcus spp.	0,099	+	0,205	++
Staphylococcus spp.	0,213	++	0,048	-
Staphylococcus spp.	0,222	++	0,115	+
Staphylococcus spp.	0,066	+	0,094	+
Staphylococcus spp.	0,216	++	0,220	++
Staphylococcus spp.	0,328	+++	0,968	+++
Streptococcus β -hemolítico	0,075	+	0,091	+
Bacilos Gram-negativos				
Escherichia coli	0,124	++	0,146	+
Escherichia coli	0,307	+++	0,067	-
Klebsiella spp.	0,077	+	0,054	-
Klebsiella spp.	0,214	++	0,210	++
Bacilo gram-negativo NFL	0,120	++	0,074	-

<i>Proteus</i> spp.	0,087	++	0,100	+
---------------------	-------	----	-------	---

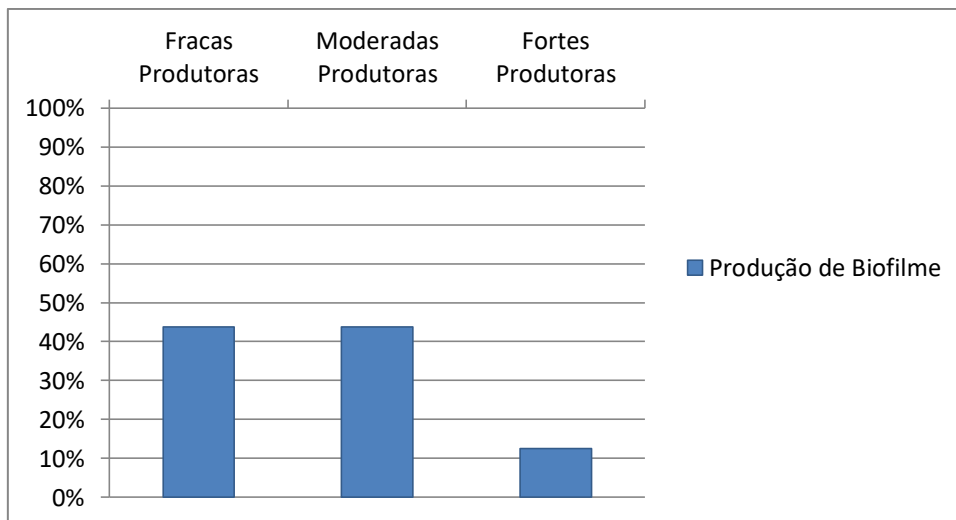
*NFL – Não Fermentadores de Lactose; (+) Fraco Produtor; (++) Moderado Produtor; (+++) Forte Produtor (-) Ausência de Biofilme.

Figura 1



*NFL – Não Fermentadores de Lactose

Figura 2



APÊNDICES

Apêndice 1. Resumo expandido apresentado no III Encontro Científico Internacional de Ozonioterapia na Medicina Veterinária e no I Congresso de Ozonioterapia da ABO3VET.

EFEITOS DA INFUSÃO DE ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS SOBRE A REMOÇÃO DO BIOFILME UTERINO EM ÉGUAS DOADORAS DE EMBRIÕES COM ENDOMETRITES PERSISTENTES

Haroldo Vargas¹; Maria Paula Tecles Brandão Vargas²; **Antonio Brito da Silva Filho**³; Gustavo Ferrer Carneiro³

¹Médico Veterinário Autônomo, especialista em Diagnóstico e Cirurgia de Equinos, IBVET, Jaguariuna, SP, Brasil; ²Discente de Medicina, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, Juiz de Fora, MG, Brasil; ³Mestrando Programa de Pós Graduação em Ciência Animal Tropical, UFRPE, Recife, PE, Brasil; ⁴Professor Associado, UFRPE, Recife, PE, Brasil. Autor para correspondência: horsesvetservices@gmail.com

Palavras chave: ozonioterapia, biofilme, bactérias, endometrite, óleo ozonizado.

INTRODUÇÃO:

As endometrites bacterianas e fúngicas são importantes complicações em programas de transferência de embriões uma vez que as doadoras de embriões têm seu sistema de defesa uterino desafiado diversas vezes durante uma estação de monta. As contaminações podem ocorrer via cobertura, inseminação artificial, falhas nas desinfecções de materiais utilizados nas coletas ou na técnica de coleta de embriões. Após uma infecção aguda, na maioria das éguas, as bactérias invasoras serão eliminadas e a infecção resolvida fisiologicamente. Contudo, em alguns casos, um pequeno número de bactérias sobrevivem e causam infecções persistentes que tornam-se difíceis de eliminar (Ferris, 2017). Em éguas tem sido reportado que infecções uterinas crônicas que são resistentes a agentes antimicrobianos pode ser causado pela produção de biofilme por esses microorganismos, que consiste em uma matriz que se adere as microcolonias impedindo a penetração dos antibióticos (LeBlanc & Causey, 2010). Bactérias que atuam no endométrio equino estão constantemente associadas à capacidade de produção de biofilme, fazendo com que os tratamentos se tornem menos eficazes. (Nascimento Jr, 2019).

O desenvolvimento do biofilme em éguas doadoras de embriões é um importante fator de subfertilidade. Devido a sua importância reprodutiva estas éguas geralmente são submetidas a exames clínicos e laboratoriais e posteriormente tratadas com antimicrobianos. Entretanto a proteção promovida pelo biofilme aos microrganismos faz com que muitos destes tratamentos não sejam eficientes, apresentando estas éguas, no primeiro ou segundo ciclo pós

tratamentos, lavados uterinos turvos e contaminados. A formação do biofilme é uma estratégia de sobrevivência para bactérias e fungos se adaptarem ao meio ambiente. Microrganismos crescendo em um biofilme são altamente resistentes a agentes antimicrobianos. O biofilme permite que as bactérias não sejam reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro, evitando sua exposição a antibióticos e levando à resistência a estas drogas (Donlan & Costerton, 2002).

Na rotina de médicos veterinários que trabalham com biotecnologias da reprodução equina são comuns infecções recorrentes em éguas doadoras de embriões tratadas com antibioticoterapia. Não raramente estas éguas apresentam lavados uterinos durante as coletas 7 a 9 dias pós ovulação com aspecto turvo sugestivo de infecções e presença de biofilme. Os tratamentos de infecções associadas ao biofilme devem objetivar a quebra do material do biofilme possibilitando assim a eliminação das bactérias que residem dentro do biofilme. (Ferris, 2017; Vargas et al., 2018).

O tratamento de infecções por biofilme representa um desafio para microbiologistas e clínicos. Sob a proteção do biofilme, as células microbianas tornam-se tolerantes e resistentes aos antibióticos, às respostas imunes, o que aumenta as dificuldades tanto para o tratamento, assim como para um diagnóstico eficaz. (Nascimento Jr, 2019). Bactérias que residem em um biofilme podem ser até 1000 vezes mais resistentes ao tratamento com antibióticos em comparação com bactérias de vida livre (Ferris, 2017).

Para serem efetivos, os agentes antimicrobianos devem atravessar uma camada de EPS, DNA, RNA, lipídios e proteínas espessas para alcançar bactérias habitantes desta barreira protetora (Ferris, 2017). Uma das principais ações do Peróxido de Hidrogênio e outros ozonídeos presentes nos óleos ozonizados é penetrar na camada lipídica de membranas celulares.

OBJETIVO:

O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de óleos vegetais ozonizados na ruptura do biofilme uterino de éguas subférteis doadoras de embrião e/ou com histórico de endometrites persistentes.

A hipótese a ser testada é que após a ruptura do biofilme ocorrerá a ação antimicrobiana dos óleos ozonizados sobre as membranas das bactérias presentes no útero.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 éguas doadoras de embriões das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, com idades variando entre 5 e 18 anos, com histórico de subfertilidade e endometrites bacterianas e/ou fúngicas recorrentes, no período de maio de 2018 a fevereiro de 2019. Todas as doadoras apresentavam lavados turvos nos processos de tentativas de coletas de embriões. Três destas éguas (éguas 1, 2 e 3) foram retiradas do programa de transferência de embriões (TE) e inseminadas para gestação. As nove demais éguas foram mantidas no programa de TE. Todas as éguas foram tratadas durante o diestro com presença de corpo lúteo ativo e cérvix fechada.

As éguas receberam infusão intrauterina de 40 ml de óleo vegetal ozonizado com teores de peróxidos > 500 ppm, na extremidade dos cornos uterinos, em infusão lenta, com pipetas flexíveis. Após a infusão as éguas receberam 1 ml de Dinoprost (Lutalyse®) IM. Após a infusão do óleo ozonizado as doadoras foram avaliadas por ultrassonografia e receberam suave massagem uterina visando a distribuição do óleo ozonizado nos cornos e corpo uterino, tentando promover uma maior penetração nas pregas endometriais e melhorando a eficiência no tratamento preconizado por Vargas et al, 2018.

Entre 48 e 54 horas após o início do tratamento as éguas foram submetidas a lavagens uterinas sucessivas com infusão de 1 litro de solução de Ringer com Lactato de Sódio utilizando-se sonda para coleta (Bivona® nº 32), em volumes que variaram de 5 à 9 litros. Os lavados somente foram interrompidos após a drenagem de soluções límpidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se remoção de diferentes quantidades de fluidos possivelmente contendo biofilme uterino. A ação do óleo ozonizado foi comprovada através da presença de óleo sobrenadante nos primeiros lavados.

Os aspectos dos lavados foram classificados como Semi-Límpidos (SL), Turvos (T), Muito Turvos (MT), Muito Turvos com presença de material sedimentado (MTMS), Purulentos (PU) estão descritos na tabela 1. Observou-se uma eficiente capacidade do óleo ozonizado na quebra da estrutura dos biofilmes facilitando a sua remoção. As éguas tratadas foram inseminadas no 1º ou 2º ciclo após o tratamento e posteriormente submetidas a coletas para transferência de embriões ou mantidas em gestação.

Todas as doadoras submetidas à coleta de embriões apresentaram lavados límpidos após o tratamento. Foram realizadas 9 tentativas de coletas de embriões no 1º e 2º ciclos pós tratamento com taxa de recuperação embrionária de 55,5% (5/9).

Das 12 doadoras tratadas, 25% (3/12) foram inseminadas para gestação tendo obtido 100% (3/3) de taxa de prenhez na primeira inseminação pós tratamento. As demais doadoras (75% - 9/12) foram mantidas no programa de TE. Destas 9 doadoras, 22,2% (2/9) foram inseminadas no 1º ciclo estral pós tratamento, com uma das doadoras apresentando um lavado positivo (com presença de embrião). As demais éguas (incluindo essa que obteve um lavado negativo no 1º ciclo) foram inseminadas no 2º ciclo pós tratamento obtendo-se a taxa de 62,5% (5/8) de lavados positivos contendo embriões (tabela 1).

Tabela 1. Relação das éguas infundidas com óleo ozonizado contendo tempo da infusão, número de infusões realizadas, aspecto pós 1º, 3º, 5º, 7º e 9º infusão, resultado pós infusão e taxa de gestação quando pertinente

Égua	Lavado pós infusão	Número Infusões	Aspecto 1ª Infusão	Aspecto 3ª Infusão	Aspecto 5ª Infusão	Aspecto 7ª Infusão	Aspecto 9ª Infusão	Coleta Embrião 1o ciclo pós tto	Coleta Embrião 2o ciclo pós tto	Gestação Pós Tto
1	56 horas	7	PU	MTMS	SM	L	X	NR	NR	GESTANTE
2	54 horas	5	MT	T	L	L	X	NR	NR	GESTANTE
3	52 horas	7	MT	MT	SL	L	X	NR	NR	GESTANTE
4	48 horas	9	PU	MTMS	MT	SL	L	NR	L / EMBRIÃO +	X
5	48 horas	6	T	SL	L	X	X	L / EMBRIÃO -	L / EMBRIÃO +	X
6	50 horas	9	MTMS	MT	T	SL	L	NR	L / EMBRIÃO -	X
7	52 horas	9	PU	MTMS	MT	SL	L	NR	L / EMBRIÃO +	X
8	50 horas	5	MT	T	L	X	X	L / EMBRIÃO +	NR	X
9	54 horas	7	MTMS	MT	T	L	X	NR	L / EMBRIÃO +	X
10	52 horas	6	MT	T	L	X	X	NR	L / EMBRIÃO +	X
11	48 horas	7	MT	T	SL	L	X	NR	L / EMBRIÃO -	X
12	48 horas	9	MTMS	MTMS	MT	T	L	NR	L / EMBRIÃO -	X

Notas: L / EMBRIÃO + = Lavado Límpido embrião positivo; L / EMBRIÃO - = Lavado Límpido embrião negativo; NR = Não realizado / X – Não inseminadas para gestação

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados alcançados, em 100% das doadoras que apresentavam lavados para recuperação embrionária com turbidez pré tratamento, comprovou-se a eficiência dos óleos ozonizados na possível ruptura do biofilme uterino, comprovado através de lavados uterinos sucessivos pós infusão. A ocorrência de lavado sem turbidez foi observada em 100% (9/9) das éguas mantidas no programa de TE. A recuperação de embriões e/ou gestações pós tratamento provavelmente também deveram-se ao efeito antimicrobiano dos óleos ozonizados associados à remoção do biofilme uterino pelos lavados. Maiores estudos serão necessários com a inclusão de culturas pré e pós tratamento em éguas subférteis para a comprovação do efeito antimicrobiano dos óleos vegetais ozonizados em aplicação intra-uterina.

BIBLIOGRAFIA:

Dantas LS, Vargas H, Nascimento Junior JAA, Sobral GG, Viana AR, Fraga Junior AM, Carneiro, GF. Ozone is able to activate chronically subclinical infected mares, VII International Symposium on Animal Biology of Reproduction – ISABR, 6 a 9 novembro de 2018.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, v.15, p.167-193, 2002.

Ferris RA. Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.41, n.1, p.74-80, 2017.

LeBlanc MM, Causey RC. 2009. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Domest Anim* 44(Suppl 3):S10–S22.

Nascimento Júnior JAA, Maciel NGP, Correia MTS, Carneiro GF. Derivados de produtos naturais são capazes de romper biofilme *in vitro* de bactérias isoladas de útero de éguas. CBRA, 15 a 17 de Maio de 2019.

Vargas, H. Remoção do biofilme uterino de éguas com endometrite uterina persistente com infusões de óleo de girassol ozonizado. In: Ozonioterapia na Clínica, Reprodução e Reabilitação de Equinos – II Simpósio Internacional de Ozonioterapia na Medicina Veterinária. São Paulo, 4 a 6 de maio de 2018.

Vargas H, Nascimento Junior JAA; Sobral GG, Viana AR, Vilar IJ, Carneiro GF. Intrauterine infusion of ozone in susceptible mare, VII International Symposium on Animal Biology of Reproduction – ISABR, 6 a 9 novembro de 2018.

Identificação de Endometrite subclínica em éguas doadoras de embriões

Mário Freitas Ihto¹; Gustavo Ferrer Carneiro²; **Antônio Brito da Silva Filho²**;
José Adelson Alves do Nascimento Júnior³; Hingrid Barbosa de Souza⁴;
Gabriela Fontes de Souza⁴; Haroldo Vargas^{5*}

¹Haras Sapecado, Itaperuna, RJ, Brasil; ²UFRPE, Recife, PE, Brasil; ²UFPE, Recife, PE Brasil; ³UNIG – Universidade Iguazu, Itaperuna, RJ, Brasil; ⁴IBVET, Jaguariúna, SP, Brasil;

Autor para correspondência horsesvetservices@gmail.com

As endometrites são uma das principais patologias do útero de éguas. Promovem alterações sobre o endométrio uterino com infecções fúngicas e/ou bacterianas que interferem na fisiologia reprodutiva das fêmeas equinas, levando a falhas de concepção e consideráveis perdas econômicas. O diagnóstico é realizado através da detecção de fluido intrauterino, vaginite, descarga vaginal, encurtamento de ciclo, etc. Entretanto, em casos de endometrite subclínica, esses sintomas podem estar ausentes. Vários autores revelaram diferentes prevalências e diferentes resultados de susceptibilidade dos microrganismos isolados em swabs cervicais e uterinos de éguas. Os tratamentos convencionais com antimicrobianos específicos indicados em culturas e antibiogramas são geralmente longos, de alto custo e com risco de ocorrer resistência dos microrganismos às drogas utilizadas. Este estudo teve como objetivo diagnosticar endometrite subclínica em éguas através de citologia e cultura microbiológica e fúngica assim como identificar a capacidade dos patógenos na formação de biofilme em éguas com histórico de infertilidade recente, examinadas em nosso laboratório. Cinquenta e duas éguas foram examinadas por palpação retal e ultrassonografia após pelo menos 3 inseminações artificiais sem prenhez diagnosticada ou 3 coletas negativas de transferência de embriões. Amostras foram coletadas para citologia uterina e exame microbiológico. Para a coleta do material, foi utilizado swab coletor estéril acoplado a escova ginecológica (PROVAR®). As amostras foram então fixadas em metanol por 10 minutos em lâminas com os swabs sendo acondicionados em tubos contendo meio de transporte (PBS), imediatamente lacrados, identificados e encaminhados ao Laboratório de Reprodução Animal (LABRAPE - UFRPE / UAG) para posterior processamento. As amostras para bactérias foram semeadas em bi-placa Ágar-sangue/ McConkey. As amostras para fungos foram cultivadas em agar Sabouraud com cloranfenicol a 10% (Difco laboratories, Detroit, MI) e incubadas a 30° C sendo acompanhados visualmente a cada 24 horas durante 7 dias. A determinação da formação de biofilme foi feita através da técnica de cristal violeta descrita por Stepanovic et al, 2000. J Microbiol Methods, 40(2):175-179. Das 52 éguas examinadas, 31 (59,6%) apresentaram infecção bacteriana e/ou fúngica, enquanto 21 (40,4%) foram negativas. No exame ultrassonográfico, 26 éguas apresentaram algum tipo de sintomatologia ao exame: presença de fluido intrauterino, presença de ar, espessamento do útero, presença de urina no vestibulo vaginal e útero, corrimento vaginal discreto ou exacerbado (transudato) e corrimento com fluido translúcido e presença de fibrina. Enquanto que 5/31 (16,1%) das éguas positivas, não apresentaram sintomatologia caracterizando uma endometrite subclínica. Dessas 5 éguas, 2 foram positivas na cultura bacteriológica para *Klebsiella* sp., enquanto as demais éguas cada uma positiva para *Streptococcus* sp, *Enterobacter* sp. e *Staphylococcus* sp. Das amostras avaliadas, 21 (67,7%) formaram biofilme incluindo as 5 amostras com endometrite subclínica. Nesse estudo foi possível identificar um número de éguas com endometrite subclínica com capacidade de produzir biofilme. A identificação do agente, assim como o conhecimento da suscetibilidade farmacológica são de fundamental importância, devido ao aumento da resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de drogas antibacterianas sem o devido diagnóstico. A formação de biofilme possivelmente é responsável pela infertilidade momentânea desses animais apesar de não apresentar sintomatologia clínica.

Palavras-chave: equino, biofilme, endometrite.

Keywords: equine, biofilm, endometritis.

ANEXOS

Anexo 1. Licença CEUA/UFRPE



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

CEUA - UFRPE
Aprovado em 21/08/2019
Validade 21/08/2021

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – D - 10

Licença para o uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	095/2019
Número do processo	23082.008142/2019-76
Data de emissão da licença	21 de agosto de 2019
Título do Projeto	Utilização de óleo de girassol ozonizado no tratamento de endometrites em éguas
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão).	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Gustavo Ferrer Carneiro
Colaboradores	Antônio Brito da Silva Filho
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Equídeo fêmea 50.Total: 50


Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza
 Coordenador CEUA-UFRPE
 SIAPE 1929164

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza - SIAPE – 1.929.164
(Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE)

Anexo 2. Ficha de identificação do animal;

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA

	Ficha Nº	Data da coleta:
		/ /
Identificação do animal		
Nome ou Nº.		
Local		
Proprietário		
Pelagem		
Marcas e sinais		
Idade		
Escore Corporal		
Observações		

Histórico Reprodutivo

Nº de estações que part.	
Nº de gestações a termo	
Nº de embriões perdidos	
Distocia	
Retenção de placenta	
Outras patologias	
Tratamentos realizados	
Observações	

Conformação do Períneo

Conformação vulvar	() Ruim () Boa () Ótima
Inserção da vulva	() Ruim () Boa () Ótima
Fechamento da vulva	() Ruim () Boa () Ótima
Pneumovagina	() Sim () Não
Urovagina	() Sim () Não
Evidências de Vulvoplastias	() Sim () Não
Observações	
Sugestivo de Endometrite	() Sim () Não

Palpação Transretal e Ultrassonografia

Cérvix		
Útero		
Edema		
Ovários	D:	E:
LIU		
Cistos		
Observações		
Sugestivo de Endometrite	() Sim () Não	

EXAMES LABORATORIAIS

Citologia Uterina

Celularidade	Baixa		Moderada		Alta
Presença de...	Muco	Detritos		Sangue	Cristais
Células Presentes	Neutrófilos	Eosinófilos		Macrófagos	Linfócitos
	Bactérias	Hifas		Leveduras	Outros
Observações					
Sugestivo de Endometrite	() Sim () Não				

Cultura Microbiológica

Crescimento Bacteriano	() Sim () Não
Características da Colônia	
Identificação	
Observações	
Sugestivo de Endometrite	() Sim () Não

Fonte: SOARES, 2017 (Adaptada)

Anexo 3. Normas de submissão para a Revista Brasileira de Reprodução Animal

Revista Brasileira de Reprodução Animal

Instruções aos autores

A **Revista Brasileira de Reprodução Animal (RBRA)** destina-se à publicação de artigos científicos, revisões (compilação de informação da literatura, demonstrando análise crítica sobre o tema e com características de excepcionalidade, a juízo do Corpo Editorial), comunicações e relatos de casos, capazes de contribuir, significativamente, para um melhor conhecimento dos fenômenos ligados à reprodução animal, bem como para a divulgação da produção científica da área. A RBRA, a partir do v.29 de 2005, é publicada exclusivamente on line e está disponível no website do CBRA (<http://www.cbra.org.br>).

Toda correspondência deverá ser encaminhada a Editor-Chefe:

Dr. Marcelo Rezende Luz

Revista Brasileira de Reprodução Animal

E-mail : rbra@cbra.org.br

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)

Av. Cel José Dias Bicalho 1224, Lj 4, Bairro São Luiz, Pampulha, CEP 31275-050, Belo Horizonte, MG
Fone: (31)3491-7122; Fax: (31)3491-7025.

E-mail : cbra@cbra.org.br e Website: <http://www.cbra.org.br>

1. POLÍTICA EDITORIAL

Os artigos submetidos à RBRA serão preliminarmente avaliados quanto às normas e a adequação ao escopo da Revista. Somente os artigos aprovados nesta etapa serão encaminhados para a análise do mérito científico por consultores ad hoc.

2. TIPOS DE ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

Artigo científico: é o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de resultados inéditos e posteriores ao planejamento da pesquisa.

Revisão: análise e discussão do que há disponível na literatura científica e técnica atual sobre um determinado tema. As informações devem ser organizadas de maneira lógica e atrativa, com o objetivo de facilitar ao leitor o acompanhamento da evolução do assunto. As conclusões referem-se ao conjunto dos artigos revistos.

Comunicação: é o relato sucinto de resultados de um trabalho científico adequadamente planejado.

Relato de caso: é o relato de um caso raro, de forma completa e de interesse da clínica médico-veterinária.

3. NORMAS GERAIS

Os artigos devem ser originais e destinados exclusivamente à publicação na RBRA.

Os autores são responsáveis pelos resultados, pelos conceitos e pelas informações contidas nos artigos.

A redação do artigo deverá estar de acordo com a lexicologia e sintaxe do idioma português. Para ortografia em português, adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras.

Para ortografia em inglês, recomenda-se o Webster's Third New International Dictionary.

As unidades de medida devem ser usadas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades. As abreviaturas e os símbolos devem ser evitados, exceto quando forem usadas unidades padrão de medidas. Os artigos submetidos a aprovação deverão estar em consonância com as normas descritas no capítulo "Preparação do para submissão".

Submissão dos artigos

Os artigos devem ser encaminhados exclusivamente, para o e-mail <rbra@cbra.org.br>. As ilustrações devem ser enviadas em arquivo separado.

Taxa de submissão

A taxa de submissão de R\$95,00 (noventa e cinco reais) por artigo deverá ser depositada na conta **Banco Itaú, Agência 3179, conta corrente 08080-3**. Uma cópia do comprovante deverá ser encaminhada ao CBRA, via email, juntamente com o artigo submetido. O artigo somente será encaminhado para avaliação se comprovada a quitação do pagamento da taxa de submissão. A taxa de submissão não será devolvida.

Taxa de publicação

Não há taxa de publicação para os artigos aceitos.

4. PREPARAÇÃO DO TRABALHO PARA SUBMISSÃO

Texto e formato dos arquivos: o artigo deve ser digitado em folha A4 (21.0 x 29.7) com 3 cm de margem (superior, inferior, esquerda, direita), **diagramado conforme arquivo modelo anexo**. Artigos não diagramados ou diagramados incorretamente não serão aceitos. O arquivo eletrônico deverá ser compatível com Word for Windows. **O artigo pode ser escrito em português, inglês ou espanhol.**

Tamanho do artigo: O artigo submetido, incluindo as ilustrações e as referências, deverá apresentar no máximo 20 páginas (artigo de revisão), 06-12 páginas (artigo científico), 05 páginas (relato de caso), 05 páginas (comunicação), 05 páginas (nota técnica).

Seções de um manuscrito científico

Artigo científico: Título; Título em inglês; Autor (es); Avaliação(ões); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Keywords; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão (ou Resultados e Discussão); Conclusões; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. O artigo científico deve conter no máximo 30 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados. (ver detalhes abaixo).

Artigo de revisão: Título; Título em inglês; Autor(es); Avaliação(ões); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Keywords; Introdução; Desenvolvimento do assunto (organizado em partes com títulos próprios e, eventualmente, subtítulos); Considerações Finais; Agradecimentos; Referências; Ilustrações. As referências devem conter no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Comunicação: Mesma estrutura do artigo científico, de forma sucinta, mas sem subtítulos. A comunicação deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Relato de caso: Título; Título em inglês; Autor(es); Avaliação(ões); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Keywords; Introdução; Metodologia diagnóstica utilizada; Resultados e Considerações Finais; Referências; Ilustrações. O relato de caso deve conter no máximo 10 referências, devendo ser no mínimo 80% de artigos científicos em periódicos indexados.

Descrição das seções de um artigo científico (os demais tipos de manuscritos devem se adaptar ao modelo): atualizar

Título: O título deve ser sucinto, mas representativo do conteúdo do artigo. Apenas a primeira palavra do título com a inicial em maiúscula (exceção para nomes próprios). A citação de suporte financeiro

deverá ser colocada junto dos agradecimentos, antes da lista de referências. **Título em português/inglês/espanhol, negrito, centralizado, Times New Roman 12.**

Título em inglês/português: Logo abaixo do título em português, versão em inglês do título em português. **Título em inglês/português, itálico, centralizado, Times New Roman 10, sem espaçamento com o título.**

Autor(es): Os nomes dos autores virão abaixo dos títulos em português e inglês, na ordem direta, por extenso. A avaliação de cada autor deverá ser indicada por algarismos arábicos sobrescritos no final do sobrenome. Nome(s) completo(s), negrito, centralizado, número da avaliação sobrescrito, Times New Roman 10.

Avaliação(ões): Deve ser citada somente a instituição principal e um segundo nível de avaliação, quando da execução do trabalho submetido, seguida da cidade, estado e país. Não citar título, cargo e função. O autor para correspondência deve ser indicado com endereço completo, telefone, fax e e-mail. Endereço(s) de avaliação: centralizado, número da avaliação sobrescrito, Times New Roman 9. **Resumo:** Narrativa sucinta dos objetivos, material e métodos (quando pertinente), principais resultados e conclusões, limitado a 200 palavras (1374 caracteres com espaço) em um só parágrafo. **Resumo – palavra em português, centralizado, negrito, Times New Roman 10. Resumo - texto: em português, justificado, parágrafo único, Times New Roman 10.**

Palavras-chave: Palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo, não ultrapassando o limite de cinco. **Palavras-chave em negrito: demais palavras justificadas a esquerda, Times New Roman 10.**

Abstract: Versão em inglês do Resumo. **Abstract - palavra: inglês, centralizado, negrito, Times New Roman 10. Abstract texto: inglês, justificado, itálico, Times New Roman 10.**

Keywords: Versão em inglês das Palavras-chave. **Keywords – palavra em negrito: demais palavras em inglês, itálico, justificadas a esquerda, máximo 5 palavras, Times New Roman 10.**

Introdução: Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho. **Títulos - palavra: português, negrito, centralizado, Times New Roman 10. Texto justificado, espaçamento simples, Times New Roman 10.**

Material e Métodos: Devem ser citados o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. É recomendado o uso restrito de subtítulos. Nos artigos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados, deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança. **Títulos: português, negrito, centralizado, Times New Roman 10. Resultados: Devem ser apresentados clara e objetivamente os principais resultados encontrados.**

Resultados – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

Discussão: Devem ser discutidos somente os resultados obtidos no trabalho. **Discussão – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.**

Conclusões: As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada. **Conclusões – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.**

Considerações finais: devem ser utilizadas para revisões de literatura, relatos de caso, Nota Técnica.

Considerações Finais – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.

Agradecimentos: Devem ser concisamente expressados. **Agradecimentos – palavra em português, negrito, centralizado, Times New Roman 10.**

Referências: Referenciar somente artigos citados e publicados. As referências devem ser listadas em ordem alfabética do(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) e a seguir do título. **Referências – palavra em português, negrito, centralizado, espaçamento simples, Times New Roman 10, ver instruções abaixo.**

Ilustrações: Compreende tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data), e a correspondente referência deve figurar na lista final. Recomendações: 1) Ilustrações idênticas ao original: os autores devem encaminhar à RBRA a autorização do autor ou detentor dos direitos autorais para reprodução. No artigo, além da identificação da fonte, os autores devem mencionar a autorização nos agradecimentos; 2) Ilustrações adaptadas ou modificadas: os autores devem identificar a fonte, acrescentando a informação "adaptado de ...".

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais apenas na separação do cabeçalho e ao final da tabela. A separação de grupos de dados no corpo da tabela deverá ser feita inserindo-se uma linha em branco. A legenda, colocada acima da tabela, recebendo inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Tabela em português, centralizada, Times New Roman 10.

Figura: Refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda deverá ser colocada abaixo da ilustração, recebendo inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico, e é referida no texto como Fig., mesmo quando se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.tif, com alta resolução. Figuras em português, centralizada, Times New Roman 10.

5. NORMAS PARA CITAÇÃO NO TEXTO E REDAÇÃO DE REFERÊNCIAS

Citação de referência no texto

A citação no texto será feita segundo as circunstâncias, podendo o(s) autor(es) e as data(s) ser(em) citado(os) entre parênteses, ou somente a data. No caso de citação de diversos autores, listar cronologicamente e, havendo coincidência de data, usar a ordem alfabética de autor. Exemplo: Dunne (1967), Morril (1967), Nutrient... (1968), Lopes e Moreno (1974) Ferguson et al. (1979), OU (Dunne, 1967; Morril, 1967; Nutrient..., 1968; Lopes e Moreno, 1974; Ferguson et al., 1979).

Referências

São adotadas as normas da ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos abaixo. Para documentos não exemplificados usar a norma original (www.abnt.org.br).

Periódicos

Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, v.48, 1987/88. p.351.

Ferguson JA, Reeves WC, Hardy JL . Studies on Immunity to alphaviruses in foals. Am J Vet Res, v.40, p.5-10, 1979.

Holenweger JA, Tagle R, Wasserman A, Schim FA, Franckel S . Anestesia geral del canino. Not Med Vet , n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

Dunne HW lang=EN-US (Ed.). lang=ES-TRAD Enfermedades del cerdo lang=ES-TRAD . México: UTEHA, 1967.

Lopes CAM, Moreno G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 14, 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: CBMV, 1974. p.97. Resumo.

Morril CC. Infecciones por clostrídios. In: Dunne HW (Ed.). lang=ES-TRAD Enfermedades del cerdo lang=ESTRAD México: UTEHA, 1967. lang=ES-TRAD p.400-415.

Nutrient requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. p.19-20.

Silva NQ. Peritonoscopia na égua. 1971. 38f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1971.

Documentos eletrônicos

Documento publicado disponibilizado em meio eletrônico

Arranjo tributário. Diário do Nordeste On Line, Fortaleza, 27. nov. 1998. Disponível em <http://www.diariodonordeste.com.br>. Acesso em 28 nov. 1998.

Guncho MR. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: Seminário de Bibliotecas Universitárias, 10, 1998, Fortaleza. Anais ... Fortaleza: Tec Treina, 1998. CD-ROM.

Política . In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática, 1998. Disponível em <http://www.priberam.pt/dIDPLO>. Acesso em 8 mar. 1999.

Quality food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2000.

Silva RN, Oliveira R. Os limites pedagógicos do paradigma style='letter-spacing:.2pt'>da qualidade total na educação. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPe, 4, 1996, Recife. Anais eletrônicos ... Recife: UFPe, 1996. Disponível em <http://www.prospeq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em 21 jan. 1997.

Documento de acesso exclusivo em meio eletrônico

Birds from Amapá; banco de dados. Disponível em <http://www.bdt.org/bdt/avifauna/aves>. Acesso em 25 nov. 1998.

Bioline Discussion List. List maintained by the Bases de Dados Tropical, BDT, in Brasil. Disponível em: lisserv@bdt.org.br. Acesso em 25 nov. 1998.

Civitas . Coordenação de Simão Pedro Marinho. Desenvolvido pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1995-1998. Apresenta textos sobre urbanismo e desenvolvimento de cidades. Disponível em: gcsnet.com.br/oamis/civitas>. Acesso em 27 nov. 1998.

Citação de citação

Devem ser evitadas. Somente a obra consultada no original deverá aparecer na lista de referências. No texto, serão citados o autor e a data do documento original, seguido da expressão "citado por" e do autor e data da obra consultada.

Artigos no prelo

Incluir na lista de referências apenas os artigos já aceitos para publicação. Após a referência, colocar a informação "No prelo". Os artigos apenas submetidos entram na categoria "Informação pessoal".

Informação pessoal

Os dados obtidos por informação oral (palestras, debates, artigos submetidos e em fase de análise, comunicação pessoal etc.) são identificados apenas no texto. Após a informação, coloca-se o autor, a data, instituição do autor e a expressão "Informação pessoal".

6. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Não serão fornecidas separatas. Os artigos são disponibilizados no formato pdf, no endereço eletrônico da revista (www.cbra.org.br). A reprodução e a tradução de qualquer artigo para fins comerciais são proibidas, sendo que transcrição em outras revistas científicas deve ser precedida de anuência do editor.

Anexo 4. Normas de submissão para o Journal “Theriogenology”.

DESCRIPTION

Theriogenology provides an international forum for researchers, clinicians, and industry professional in **animal reproductive biology**. This acclaimed journal publishes articles on a wide range of topics in **reproductive and developmental biology**, of domestic mammal, avian, and aquatic species as well as wild species which are the object of veterinary care in research or conservation programs.

AUDIENCE

Individuals involved in animal reproduction biology.

IMPACT FACTOR

2019: 2.094 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Focus on: Veterinary Science and Medicine

AGRICOLA

CAB International

Global Health (Index Veterinarius, Veterinary Bulletin)

PubMed/Medline

BIOSIS Citation Index

Chemical Abstracts

Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Elsevier BIOBASE

Science Citation Index

Derwent Biotechnology Abstracts

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

F. Gandolfi, University of Milan, Department of Agricultural and Environmental Sciences - Production, Landscape, Agroenergy, Milano, Italy

Associate Editors

L. Brito, Madison, WI, United States

M-A. Driancourt, Astek, Boulogne Billancourt, France

Editorial Board

J. F. Asturiano, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain

Aurich, University of Veterinary Medicine Vienna, Wien, Austria

M.R. Bakst, USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, United States

I. Barrier Battut, National Professional School of Haras, Exmes, France

A. Blitek, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Department of Hormonal Action Mechanisms, Olsztyn, Poland

R. Boni, University of Basilicata, Potenza, Italy

S. Chastant, National Veterinary School Toulouse, Toulouse, France

P. Comizzoli, Smithsonian's National Zoo & Conservation Biology Institute, Washington, District of Columbia, United States

R.A. Dailey, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, United States

S. Eghbalsaiied, Islamic Azad University Isfahan Branch, Department of Animal Science, Isfahan, Iran, Islamic Republic of

F.C. Gwazdauskas, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States

S. Hochi, Shinshu University - Ueda Campus, Ueda, Japan

R. Kasimanickam, Washington State University, Pullman, Washington, United States

K. Kikuchi, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan

A. K. McNeel, Zoetis Genetics, Kalamazoo, Michigan, United States

A. Menchaca, Institute of Animal Reproduction of Uruguay, Montevideo, Uruguay
S. Nagy, Pannon University Department of Animal Sciences, Keszthely, Hungary
C.E. Pope, Audubon Nature Institute, New Orleans, Louisiana, United States
V. H. Rao, Sri Venkateswara Veterinary University, Tirupati, India
J. Roca, University of Murcia, Department of Medicine and Animal Surgery, Murcia, Spain
M. Sharafi, Tarbiat Modares University, Department of Animal Science, Tehran, Iran, Islamic Republic of
A. Snider, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, United States
N. Songsasen, Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, United States
L. Spicer, Oklahoma State University, Department of Animal and Food Sciences, Stillwater, Oklahoma, United States
R. Ungerfeld, University of the Republic, Department of Veterinary Biosciences, Montevideo, Uruguay
B. K. Whitlock, The University of Tennessee Knoxville Institute of Agriculture, Knoxville, Tennessee, United States
M. Yeste, University of Girona, Girona, Spain

GUIDE FOR AUTHORS

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. *Review Articles* should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals. *Letters to the Editor* offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission Checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

It is recommended that the manuscript should be submitted in Word document

- Include keywords

- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex](#) and [gender](#) should be used correctly. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patente applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the

addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases. For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services) Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files

to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://ees.elsevier.com/therio/default.asp>.

Referees Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof Reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>. Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304. Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003]. Reference to a dataset: [dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize

the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described. There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum

- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy." The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

theriochart.jpgchart

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

μL - microliter

m - meter

min - minute

mo - month

s - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

y - year

Routes of treatment

id - intradermal

im - intramuscular

iu - intrauterine

iv - intravenous

sc - subcutaneous

po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P - probability

SD - standard deviation
SEM - standard error of the mean
r - correlation coefficient
r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).