

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NO
TRATAMENTO DE ENDOMETRITE PÓS COBERTURA EM ÉGUAS
SUSCEPTIVEIS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

MARIA CLARA VIANA BARROSO TRAMONTANA

VILA VELHA

2023

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NO
TRATAMENTO DE ENDOMETRITE PÓS COBERTURA EM ÉGUAS
SUSCEPTIVEIS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de
Pós-Graduação em Ciência
Animal, para obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal.

MARIA CLARA VIANA BARROSO TRAMONTANA

VILA VELHA
2023

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

T771u Tramontana, Maria Clara Viana Barroso.
Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) no tratamento de
endometrite pós cobertura em Éguas susceptíveis da raça
mangalarga marchador / Maria Clara Viana Barroso
Tramontana – 2023.
54 f. : il.
Orientador: Maurício Gomes Favoreto.
Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Vila Velha, 2023.
Inclui bibliografias.

1. Medicina veterinária. 2. Éguas. 3. Manga-Larga (cavalo).
4. Endometrite. I. Favoreto, Maurício Gomes. II. Universidade
Vila Velha. III. Título.

CDD 636.89

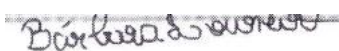
MARIA CLARA VIANA BARROSO TRAMONTANA

**UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) NO
TRATAMENTO DE ENDOMETRITE PÓS COBERTURA EM ÉGUAS
SUSCEPTIVEIS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de
Pós-Graduação em Ciência
Animal, para obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 22 de maio de 2023.

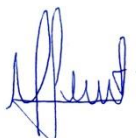
Banca examinadora:



Prof.(a). Dr.(a). Bárbara Loureiro (UVV)



Prof. Odael Spadeto



Prof. Dr. Maurício Gomes Favoreto (UVV)
(Orientador)

*Dedico esse trabalho à minha
mãe, Ivonete V. B. B.
Tramontana, ao meu pai,
Leonardo B. Tramontana,
minha irmã Maria Eliza V. B.
Tramontana, minha avó Maria
da Conceição C. B.
Tramontana e aos meus
animais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele não teria sonhado e realizado estar onde me encontro hoje. É Dele que tiro forças para continuar e lutar pelos meus sonhos.

Agradeço à minha família, por todo apoio, compreensão, incentivo e vibração com a minha carreira profissional.

Agradeço aos meus animais, que me motivam e me mostram a cada dia que passa o significado de parceira e amor verdadeiro.

Agradeço ao meu orientador Maurício Gomes Favoreto, que sempre me incentivou a ser a profissional que sou hoje, assim como também Bárbara Loureiro. Eles representam profissionais na qual eu almejo um dia ser e servem como espelho pra minha vida profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 INFLAMAÇÃO UTERINA.....	14
2.2 CAUSAS INFECCIOSAS E NÃO INFECCIOSAS.....	15
2.3 MECANISMOS DE DEFESA UTERINA.....	17
2.4 TRATAMENTO DA ENDOMETRITE	18
2.5. DIAGNÓSTICO DA ENDOMETRITE	19
2.6. UTILIZAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	20
3 HIPÓTESES	24
4 OBJETIVO	25
5 MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	26
5.3 CONFEÇÃO E UTILIZAÇÃO DO PRP	26
6 RESULTADOS.....	30
7 DISCUSSÃO	36
8 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

TRAMONTANA, Maria Clara V. B, M. Sc., Universidade de Vila Velha – ES, maio de 2023. **Utilização do Plasma rico em plaquetas (PRP) no tratamento de Endometrite pós cobertura em Éguas susceptíveis da raça Mangalarga Marchador.** Orientador: Maurício Gomes Favoreto.

A endometrite persistente pós-cobertura é considerada a terceira doença que mais acomete os equinos e a primeira causadora de subfertilidade em éguas, acarretando em resultados negativos na reprodução equina com baixa taxa de recuperação embrionária. Este estudo tem como objetivo discutir a utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) e sua resposta sobre a inflamação em éguas susceptíveis a endometrite. Trabalhos publicados demonstraram a importância de tratamentos inovadores e na imunomodulação da inflamação uterina em éguas acometidas pela enfermidade. A endometrite tem como causas infecciosas por microrganismos como fungos e bactérias, e não infecciosas geradas pelo sêmen no processo da inseminação artificial/monta natural. A utilização de antimicrobianos, anti-inflamatórios, agentes ecbólicos e lavagens uterinas no tratamento da endometrite é discutida, visto que algumas éguas já não respondem ao tratamento convencional. O uso do PRP em infusões intrauterinas vem ganhando espaço como novo tratamento com o intuito de auxiliar a resposta inflamatória uterina exacerbada devido à suas propriedades antimicrobianas, regenerativas, anti-inflamatórias, quimiotáticas, remodeladoras, angiogênicas e auxílio da repitelização, gerando resultados positivos sob o acúmulo de líquido intra-uterino, na citologia uterina e por fim na taxa de recuperação embrionária positiva. Através da sua obtenção autóloga, há um risco mínimo de contaminação ou reação alérgica ao animal tratado, além de ser um método barato, rápido e eficaz. Baseado em estudos existentes, éguas com endometrite persistente pós cobertura tiveram redução do acúmulo de líquido intra-uterino em até 96h pós tratamento, citologia uterina com redução das células polimorfonucleares de 24 à 72h pós tratamento e taxas de recuperação embrionária elevadas quando comparadas a um grupo controle. Nesse estudo, foram selecionadas 15 éguas classificadas como susceptíveis à endometrite por históricos anteriores de resultados negativos na reprodução e avaliações ultrassonográficas e citológicas. O

foco do tratamento foi utilizar o plasma rico em plaquetas vinte e quatro horas antes da inseminação artificial e avaliar os resultados de evolução do tratamento vinte e quatro horas após a inseminação, com classificação posterior do resultado positivo ou negativo diante da prenhez ou recuperação embrionária, com 15 dias e 8 dias, respectivamente. Para obtenção do PRP foi utilizado o método manual de decantação nos tubos de citrato de sódio a 3,2%, resultando em 10-20mL de PRP para infusão intrauterina. Conclui-se que o PRP auxiliou no controle inflamatório, modificando o cenário uterino e alteração positiva da citologia, líquido intrauterino e resultado positivo de prenhez e/ou recuperação embrionária.

Palavras chaves: endometrite; PRP; inflamação; subfertilidade; éguas.

ABSTRACT

TRAMONTANA, Maria Clara V. B, M. Sc., Universidade de Vila Velha – ES, maio de 2023. **Use of platelet-rich plasma (PRP) in the treatment of post-breeding endometritis in susceptible mares of the Mangalarga Marchador breed.** Advisor: Maurício Gomes Favoreto.

Persistent post-breeding endometritis is considered the third disease that most affects horses and the first cause of subfertility in mares, resulting in negative results in equine reproduction with a low rate of embryonic recovery. This study aims to discuss the use of platelet-rich plasma (PRP) and its response to inflammation in mares susceptible to endometritis. Published work has demonstrated the importance of innovative treatments and immunomodulation of uterine inflammation in mares affected by the disease. Endometritis has infectious causes caused by microorganisms such as fungi and bacteria, and non-infectious causes generated by semen in the process of artificial insemination/natural breeding. The use of antimicrobials, anti-inflammatories, ecboic agents and uterine lavages in the treatment of endometritis is discussed, as some mares no longer respond to conventional treatment. The use of PRP in intrauterine infusions has been gaining ground as a new treatment with the aim of helping the exacerbated uterine inflammatory response due to its antimicrobial, regenerative, anti-inflammatory, chemotactic, remodeling, angiogenic properties and help with repithelialization, generating positive results under the accumulation of intrauterine fluid, in uterine cytology and finally in the positive embryo recovery rate. By obtaining it autologously, there is a minimum risk of contamination or allergic reaction to the treated animal, in addition to being a cheap, fast and effective method. Based on existing studies, mares with persistent endometritis after breeding had a reduction in the accumulation of intrauterine fluid within 96 hours post-treatment, uterine cytology with a reduction in polymorphonuclear cells from 24 to 72 hours post-treatment and high embryonic recovery rates when compared to a group control. In this study, 15 mares classified as susceptible to endometritis were selected due to previous histories of negative reproductive results and ultrasound and cytological evaluations. The focus of the treatment was to use platelet-rich plasma twenty-four hours before artificial insemination and evaluate the results of the treatment twenty-four hours after

insemination, with subsequent classification of the positive or negative result in terms of pregnancy or embryonic recovery, with 15 days and 8 days, respectively. To obtain PRP, the manual decantation method was used in 3.2% sodium citrate tubes, resulting in 10-20mL of PRP for intrauterine infusion. It is concluded that PRP helped in inflammatory control, modifying the uterine scenario and positive changes in cytology, intrauterine fluid and positive pregnancy and/or embryo recovery results.

Keywords: endometritis; PRP; inflammation; subfertility; mares.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os programas de reprodução assistida no Brasil possuem em seu plantel animais de alto valor zootécnico, contando com 30% de éguas doadoras de embrião com idade acima de 18 anos, que em consequência apresentam o seu declínio na capacidade reprodutiva e baixos índices de fertilidade (CANERVALE, 2008; ALVARENGA; CARMO, 2009). O Brasil destaca-se entre os três principais países com maior número de animais de raça, dentre elas Mangalarga Marchador, Quarto de Milha, Campolina e Appaloosa. A demanda por animais que apresentam melhoramento genético representa um avanço na equideocultura brasileira utilizando das biotécnicas de reprodução animal, permitindo a amplificação em território nacional e até mesmo internacional das grandes genéticas. Para tal, temos transmissões hereditárias excelentes estabelecidas em plantéis de éguas multíparas, que já passaram por manipulações uterinas e que apresentam idade avançada. Com isso, às propensões de desordens do sistema reprodutivo aumentam e geram prejuízos aos proprietários.

Dessa forma, a endometrite persistente pós cobertura, classificada como uma inflamação ou infecção do endométrio é uma enfermidade que gera resultados negativos na reprodução equina, sendo uma das principais causas de baixa eficiência reprodutiva, a terceira doença que mais acomete os equinos e a primeira causa de subfertilidade em éguas (TROEDSSON, 1999; SEGABINAZZI et al., 2021). Cerca de 25-60% desses animais que não apresentam resultados positivos de prenhez ou embrião possuem quadros de infecção ou inflamação uterina (CANISSO et al., 2020).

As éguas podem ser categorizadas como resistentes ou susceptíveis à endometrite, de acordo com a sua resposta e capacidade de debelar o processo inflamatório em 48-72 horas pós cobertura. A endometrite persistente pode ser causada por fungos, bactérias e também pelo sêmen utilizado nas biotécnicas. No momento pós cobertura, as éguas passam por um processo fisiológico de resposta inflamatória uterina, que é considerado transitório, ocorrendo com o intuito de limpeza do útero pelo excesso de sêmen e dos microrganismos que podem ter entrado em contato (TROEDSSON et al., 1998). No entanto, em casos de persistência em éguas consideradas susceptíveis, essa resposta inflamatória se torna prolongada, levando a um ambiente uterino

impróprio para a chegada de um embrião, afetando assim a recuperação embrionária (CARNEVALE et al., 2000; SEGABINAZZI et al., 2021).

O plasma rico em plaquetas é obtido de forma autóloga através do sangue total, com uma separação entre glóbulos vermelhos e células brancas (leucócitos) para a concentração das plaquetas em um determinado volume de plasma (SOARES et al., 2020; SEGABINAZZI et al., 2021). A partir disso é obtido propriedades imunomoduladoras associadas à liberação e armazenamento de fatores de crescimento que são capazes de aumentar a cicatrização, como também efeitos mitogênicos, neovasculares e anti-inflamatórios (ALVAREZ et al., 2011; CARMONA et al., 2009). Também é válido citar que os grânulos das plaquetas apresentam citocinas que possuem peptídeos antimicrobianos, atuando de forma benéfica contra as infecções bacterianas provenientes de endometrites persistentes e endometrites degenerativas crônicas, que acarretam de forma negativa na fertilidade (SEGABINAZZI et al., 2017; REGHINI et al., 2016; METCALF et al., 2012). O PRP é capaz de regular de forma negativa as citocinas pró inflamatórias e inibir a cascata desencadeada pelo fator nuclear Kappa, modulando as resposta inflamatória estabelecida (BENDINELLI et al., 2010; VAN BUUL et al., 2011).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atuação do plasma rico em plaquetas sob o processo inflamatório uterino em éguas susceptíveis a endometrite da raça Mangalarga Marchador, confirmada por citologia uterina e conteúdo luminal uterino presente avaliado via ultrassonografia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inflamação uterina

A inflamação ou infecção do endométrio, denominada endometrite, é considerada a terceira doença que mais acomete os equinos e primeira causadora de subfertilidade. Segundo TROEDSSON (1999), a endometrite ocorre para a eliminação do excesso de plasma seminal, sujidades e sêmen no processo da inseminação artificial ou monta natural. Quando a inflamação persiste há uma luteólise prematura devido à produção de prostaglandina pelo endométrio lesionado, lisando o corpo lúteo e em consequência causando uma perda embrionária. Além disso, há uma alteração ambiental uterina, tornando um local hostil para a sobrevivência de um embrião (ENGLAND, 2005).

Após o contato do sêmen com o ambiente uterino, as contrações miométrais e o processo inflamatório fisiológico são necessários, visto que os espermatozoides precisam se deslocar para a fertilização e para que tenham uma sobrevivência no trato reprodutivo das éguas (TROEDSSON et al., 1998). Em torno de quatro horas esse processo se estabiliza e o número suficiente de espermatozoides atinge a tuba uterina para realizar a fertilização de encontro com o oócito (BRINSKO et al., 1991). As contrações miométrais em éguas saudáveis acontecem da ponta do corno uterino em direção à cérvix, auxiliando na eliminação de conteúdo desnecessário, já em éguas susceptíveis a endometrite, de acordo com um estudo *in vitro*, as contrações não são rítmicas e o útero tende a se contrair de forma contrária à eliminação do conteúdo, em direção ao corno uterino, podendo ser a causa primária de uma endometrite (TROEDSSON, 1999; REITZENSTEIN et al., 2002).

2.2 Causas infecciosas e não infecciosas

As causas não infecciosas, como já citado brevemente no texto acima, estão ligadas com o contato que o sistema reprodutivo da fêmea possui com o plasma seminal, sujidades e sêmen na inseminação artificial ou monta natural (TROEDSSON, 1999). Em conjunto com esses fatores, podemos encontrar éguas com conformação perineal inadequada, útero pendular, idade avançada e falha no *clearance* uterino que atua favorecendo o desenvolvimento da endometrite (DELL'AGUA JR., 2004; WOODWARD et al., 2012; CARD, 2005). As causas infecciosas que podem gerar quadros de endometrite são ocasionadas por agentes como bactérias e fungos, a exemplos de *Streptococcus equi*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cândida spp* e *Aspergillus spp*, respectivamente. Ainda assim também é possível a endometrite gerada por múltiplos fatores, infecciosos e não infecciosos em conjunto (TROEDSSON, 1998; LEBLANC, 2009; WALTER et al., 2012; BELTAIRE et al., 2012; FRONTOSO et al., 2008).

2.3 Suscetibilidade à endometrite em éguas

As éguas podem ser classificadas como susceptíveis ou resistentes à endometrite, de acordo com o mecanismo e capacidade das mesmas na eliminação da inflamação em 48-72 horas após o contato com o sêmen. De forma fisiológica, as éguas apresentam uma resposta inflamatória uterina transitória após o contato com o sêmen via inseminação artificial ou monta natural em até 30 minutos, com um pico entre 6 às 12h, e decrescente entre 24- 48 horas, havendo migração dos neutrófilos como as primeiras células inflamatórias a se direcionarem para o lúmen uterino e estabelecimento de uma resposta inflamatória, ajudando a eliminar o excesso de sêmen, detritos do lúmen uterino, o plasma seminal e microrganismos que podem contaminar o ambiente e gerar uma possível infecção. Os neutrófilos, em contato com o endométrio, secretarão mediadores quimiotáticos e citocinas no local, induzindo uma maior inflamação (TROEDSSON, 1998; ALGHAMDI, et al., 2005; TROEDSSON, 1997).

As éguas consideradas susceptíveis apresentam uma resposta inflamatória uterina prolongada e um início da modulação inflamatória tardia, predispondo o acúmulo do fluido intrauterino e de neutrófilos polimorfonucleares (CARNEVALE, et al., 2000; BUCCA et al., 2008; WOODWARD et al., 2013). Além disso, as éguas susceptíveis apresentam idade mais avançada, conformação vulvar inadequada, útero pendular (TRAUB-DARGATZ, 1991; TROEDSSON, 1999; LEBLANC et al., 1994; TROEDSSON et al., 1994; SCOGGIN, 2015; WOODWARD et al., 2012, CUERVO-ARANGO, 2019) e frequência, duração e intensidade baixas de contrações miométrais que auxiliam na limpeza física uterina (TROEDSSON, 1993), demonstrando uma falha na defesa uterina fisiológica, possivelmente ocasionada nas mudanças de liberação de ocitocina e prostaglandinas (RIGBY et al., 2001). Em casos de persistência em éguas consideradas susceptíveis, essa resposta inflamatória se torna prolongada, levando a um ambiente uterino impróprio para a chegada de um embrião, afetando assim a recuperação embrionária (CARNEVALE et al., 2000; SEGABINAZZI et al., 2021). Éguas protocoladas para transferência embrionária tornam-se também susceptíveis a endometrite visto que são manipuladas e lavadas várias vezes em uma única estação de monta (SQUIRES, 2013).

O ambiente uterino inflamado diante de uma endometrite também prejudica a motilidade espermática, diminuindo as chances de um resultado positivo. Os espermatozoides se ligam às células polimorfonucleares, impedindo um maior número de células espermáticas sendo transportadas até o oviduto, reduzindo a fertilização (ALGHAMDI et al., 2001).

Éguas multíparas podem apresentar alterações degenerativas, inserindo-as no grupo das susceptíveis a endometrite. Após consecutivos partos, há um estiramento dos ligamentos largos, deslocando de forma crânio ventral o útero até abdômen, dificultando a eliminação e a drenagem de conteúdo até a cérvix (LEBLANC, 2003).

2.3 Mecanismos de defesa uterina

Os macrófagos, segunda linha de defesa, realizam atividade fagocítica e auxiliam o reparo do tecido danificado, como nos casos de uma inflamação uterina e ambiente alterado, intensificando assim a resposta imune gerada (TIZARD, 1998). Os leucócitos também fazem parte da linha de defesa uterina, produzindo citocinas, que atuam como sinalizadoras entre as células, e mediadores quimiotáticos. Os leucócitos também liberam prostaglandinas, gerando contração do miométrio e ajudando na limpeza uterina em éguas consideradas saudáveis (KATILA, 1995; WOODWARD et al., 2013; TIZARD, 2009; TROEDSSON et al., 1995). Nesse momento, a liberação de citocinas como as interleucinas e fator de necrose tumoral alfa modulam a resposta inflamatória aguda (FUMUSO et al., 2007).

O acúmulo de líquido intraluminal, produção de citocinas pró inflamatórias e a neutrofilia persistente encontrada na endometrite são embriotóxicas, diminuindo as chances de resultados positivos na prenhez e protocolos de transferência embrionária devido a formação de um ambiente hostil para sua sobrevivência (ROBERTSON et al., 2018; TROEDSSON, 1997). Em conjunto com o aumento do tônus cervical e produção da progesterona, o embrião equino é transportado pela tuba uterina até o lúmen uterino entre 6 e 7 dias após a ovulação, sendo necessário que uma inflamação estabelecida seja debelada dentro desse prazo para que haja um ambiente adequado para sobrevivência desse embrião (FREEMAN et al., 1991).

O processo inflamatório é iniciado quando a presença de um agente infeccioso ou não infeccioso, como a exemplo do sêmen, entra em contato com o útero, que ativa os receptores Toll-like (TLRs) nas células endometriais. Com isso, há expressão do fator nuclear Kappa B (NF- κ B) no tecido inflamado, que ativa a COX-2, quimiocinas e outras citocinas pró inflamatórias, regulando para as células do sistema imune os sinais inflamatórios (GIRLING 2007; TIZARD, 2008). Há também a síntese de prostaglandinas (PGF-2 α) sintetizadas por NF- κ B nos tecidos inflamados, e consequentemente levam a uma luteólise e perda embrionária (ULIVI et al., 2008; BOERBOOM et al., 2004). Quanto maior o processo inflamatório endometrial, maior liberação de prostaglandina e luteólise, ocasionando insucesso na recuperação embrionária. Também é válido citar que maiores concentrações de PGF-2 α afetam a

estrutura do corpo lúteo e em consequência diminui os níveis de progesterona, essencial para a manutenção da gestação (TROEDSSON et al., 2001; NIE et al., 2003)

2.4 Tratamento da endometrite

O tratamento para endometrite é baseado em terapia multimodal, com antibióticos, anti-inflamatórios, lavagens uterinas e agentes ecbólicos de acordo com a causa e o grau de acometimento, porém, algumas éguas já não respondem ao tratamento convencional e tradicional do mercado (CANISSO et al., 2016; SCOGGIN, 2016). Os tratamentos propostos visam mudar o cenário inflamatório, corrigir a contaminação bacteriana, aumentar uma resposta imune e alterar os defeitos anatômicos que predisõem a entrada de sujidades (REGHINI et al., 2016).

Diante disso, podemos observar que nas causas infecciosas, as bactérias e fungos são capazes de produzir o biofilme, um agregado das secreções e de microrganismos, funcionando como uma barreira que dificulta a ação dos antimicrobianos, tornando resistente a terapia (FERRIS, 2017; FERRIS, 2014; SHAH et al., 2006; MUSTOE, 2004; MAH, 2001). A endometrite tradicionalmente também é tratada com ecbólicos, para a estimulação das contrações uterinas e auxílio na eliminação do líquido intrauterino acumulado (CADARIO, 1995), e com antimicrobianos, após a identificação do tipo bacteriano e a sensibilidade, visto que a resistência aos antimicrobianos hoje é uma realidade dentro da reprodução animal. Pode ser utilizada com infusões intrauterinas em doses únicas ou sistêmicas, a exemplo do ceftiofur, penicilina, gentamicina e amicacina (DASCANIO, 2011).

A lavagem uterina pode auxiliar na remoção do líquido intrauterino acumulado, remoção física de detritos e sêmen restante no lúmen, podendo ser associada com um agente mucolítico a exemplo da N-acetilcisteína para quebra do biofilme, complementando as outras abordagens de tratamento (BRINSKO et al., 2003; VANDERWALL, 2003). O uso de anti-inflamatórios não esteroides requer cautela, a exemplo do flunixin meglumine devido à diminuição da produção de prostaglandinas, que em consequência diminuem a atividade de contração miometral e dificultando a

eliminação do líquido intrauterino acumulado. A utilização de anti-inflamatórios COX-2 seletivo seria a via mais indicada, a exemplo do firocoxib, atenuando a resposta inflamatória uterina (REILAS et al., 2006; FRISO et al., 2019).

2.5. Diagnóstico da endometrite

Para diagnosticar a endometrite em éguas, a abordagem deve ser multifatorial em associação do histórico clínico como de acúmulo de líquido intrauterino via ultrasonográfica, falhas em resultados positivos de prenhez/recuperação embrionária e retorno ao estro precoce, juntamente com os exames complementares como a cultura endometrial, biopsia e citologia.

A citologia pode ser empregada na associação do tipo e a proporção de células inflamatórias encontradas em comparação das células endometriais (NIELSEN, 2005; FERRIS, 2015). Essas amostras podem ser obtidas por lavagem uterina de baixo volume ou por escova citológica, realizando-se o esfregaço e coloração em panótico para avaliação. A porcentagem de células polimorfonucleares é determinada em 100 células epiteliais e classificadas posteriormente em porcentagem de tecido não inflamado (<5%), inflamação leve (5- <15%), moderada (>15 - <30%) e intensa (>30%) como descrito por SEGABINAZZI et al. (2017).

A escova citológica é um método barato e rápido para coleta de amostras, porém apenas um segmento uterino é coletado por uma amostra local, portanto infecções focais podem ser perdidas caso a amostra não seja específica. O lavado de baixo volume atinge toda a superfície uterina, permitindo uma coleta mais fidedigna de células, porém há o risco de contaminação com microrganismos do trato reprodutivo caudal (RIDDLE, 2007; CANISSO, 2016). A lavagem uterina por baixo volume vem com a proposta de melhorar o diagnóstico da endometrite com base nos achados citológicos e microbiológicos que essas amostras fornecem. Esse “flush” é realizado com Ringer Lactato, inserido intrauterino com auxílio de sonda de lavado de embrião conectada a um equipo em Y, que realiza a entrada do líquido até o útero e a sua saída posteriormente até o tubo coletor da amostra. Com isso, é possível realizar a citologia endometrial. Utiliza-se de 50-10mL de Ringer Lactato para a amostragem,

atingindo toda a superfície uterina e fornecendo uma amostra real da contaminação (LEBLANC, 2007).

A avaliação ultrassonográfica é utilizada para a detecção da presença e aparência do líquido intrauterino acumulado, mas que deve ser avaliado de forma complementar visto que nem todas as éguas que sofrem de endometrite acumulam líquido, particularmente as afetadas por endometrite subclínica (OVERBECK, 2011).

A biopsia é uma técnica segura e rápida, utilizada principalmente nas avaliações histológicas e casos de fibrose endometrial, considerada específica para tal resultado. Essa técnica também pode ser empregada nos casos de infecções profundas endometriais. Porém é válido ressaltar que a biopsia é uma técnica considerada invasiva e requer profissional habilitado (RIDDLE, 2007; CANISSO, 2016).

2.6. Utilização do plasma rico em plaquetas

O PRP tem sido utilizado em cirurgias ortopédicas e na evolução de lesões em tecidos moles, sendo também idealizado no cenário da reprodução equina para o tratamento da endometrite (LOPEZ et al., 2010; REGHINI et al., 2016). O PRP é composto pelo plasma sanguíneo total com um concentrado de plaquetas adquirido de forma autóloga (HESSEL et al., 2015; MUIR et al., 2019). Os grânulos das plaquetas apresentam diversos fatores como fator de crescimento epidérmico, crescimento endotelial vascular, crescimento fibroblástico, fator transformador de crescimento (TGF- γ 1, TGF γ 2), levando a angiogênese, reepitelização do tecido tratado, regeneração tecidual e difusão de macrófagos (AMABLE et al., 2013; BENDINELLI et al., 2010; OPNEJA et al., 2019).

Os fatores de crescimento derivados das plaquetas auxiliam no efeito mitogênico epitelial e do estroma endometrial, estimula a migração quimiotática, ativa as células progenitoras endometriais, fazendo com que haja migração, proliferação e maior contratilidade das células estromais endometriais (Matsumoto et al. 2005; Nilsson et al. 2006). O fator de crescimento γ (TGF γ) ajuda a regular as respostas imunes no útero (Knight e Glister 2006; Stoikos et al. 2008), os fatores de crescimento epidérmico

auxiliam nas células endometriais, suas proliferações e na repitelização do endométrio, ajudando também no fornecimento aos blastocistos pela melhora da glicogenólise (Silva JR et al. 2004; Gargett et al. 2012). Os fatores de crescimento de fibroblastos auxiliam na angiogênese do endométrio e na reorganização endotelial (Garor et al. 2009; Demir et al. 2010), e os fatores de crescimento endotelial vascular na angiogênese do endométrio (Kosaka et al. 2007). O fator de crescimento de hepatócitos, também fornecido na utilização do PRP, ajuda na interrupção da atividade do nFkB (BENDINELLI et al., 2010).

Na rotina prática do tratamento de endometrite em éguas, o PRP atua na regeneração tecidual, a sua potente ação anti inflamatória esta relacionada a capacidade de supressão das expressões de metaloproteinases, expressão endometrial de COX-2, regulação das citocinas pró inflamatórias (interleucinas 1 e 6), formação neovascular, diminuição do número de células polimorfonucleares e fator de necrose tumoral, mitose celular e quimiotaxia (MAZZOCA et al., 2013; CIESLIK et al., 2009; CANISSO, 2016; KIM et al., 2014).

A utilização do PRP em humanos é recorrente e benéfica, visto que os grânulos das plaquetas, por apresentarem peptídeos microbianos, contribuem na ação contra *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, causadoras da endometrite em mulheres. Em equinos, também podemos encontrar essa contaminação microbiana como causa da endometrite, sendo uma saída no uso animal (CIESLIK et al., 2009; KIM et al., 2014). A utilização do PRP ajuda a modular a resposta inflamatória gerada pelo sêmen em contato com o útero, aumentando as chances de prenhez positiva e auxiliando na endometrite (SEGABINAZZI et al., 2017).

REGHINI et al. (2016) sugeriram que a infusão intrauterina de PRP é capaz de modular a resposta imune e auxiliar na redução do líquido intrauterino de éguas afetadas pela endometrite. METCALF (2014) relata que as taxas de prenhez em éguas aumentaram com a utilização do PRP, assim como também relatado resultados positivos na utilização em mulheres que apresentavam quadros de falhas na implantação como relatado por HAJIPOUR et al. (2018), mostrando que a qualidade do endométrio é essencial e encontra-se na linha de frente do processo tanto em mulheres quanto em éguas, apesar dos fatores imunológicos e qualidade embrionária também afetarem essa taxa (WANG et al., 2019).

As respostas inflamatórias são possivelmente reguladas pelo fator nuclear Kappa B (NF- κ B), encontrados no tecido inflamado, vistos de forma inativa no citoplasma de células endometriais. O NF- κ B, considerado uma grande válvula na inflamação e na via de sinalização para expressão de COX-2, modula a expressão de PFG2 α influenciando na luteólise do diestro (NEELY et al., 1979; BOERBOOM, et al., 2004). No processo crescente da inflamação, a síntese de PGF α aumentada pode ocasionar perda embrionária precoce. Nas respostas inflamatórias estabelecidas, a indução da fosforilação do NF- κ B acontece, desencadeando a expressão de todos os fatores pró inflamatórios envolvidos. Dito isso, é necessário prevenir que a fosforilação aconteça no tecido inflamado. Essa prevenção pode ser vista quando se utiliza do PRP, inibindo seu efeito e agindo de forma anti-inflamatória (CUNDELL E MICKLE 2018; CRONIN et al., 2012; ANDIA E MAFFULLI, 2013).

Em estudos humanos, a utilização do PRP foi capaz de aumentar a proliferação e também a migração das células endometriais, agindo de forma benéfica em mulheres inférteis devido a neo-angiogênese e regulação da implantação devido a sua ação sob prostaglandinas, proteínas tumorais p53 e receptores de progesterona e estrogênio (AGHAJANOVA et al., 2018).

Com o aumento de líquido intrauterino e da perfusão sanguínea no processo inflamatório, há uma maior migração dos neutrófilos pela parede dos vasos até o lúmen uterino (BURLESON et al., 2010). Com a utilização do PRP, há a capacidade de redução da quantidade de neutrófilos em até 24h após a utilização, de acordo com METCALF (2012), que observou a regulação de citocinas pró inflamatórias uterinas no tratamento.

A utilização do PRP é segura e devido sua fonte autóloga tem risco mínimo de disseminação de doenças ou de respostas imunogênicas pelo seu uso, não sendo demonstrado qualquer efeito negativo sobre as estruturas ovarianas e uterinas pós administração, além das suas funções anti microbianas que auxiliam na prevenção das infecções (EVERTS et al., 2006; DEHGHANI et al., 2018; ULBIN-FIGLEWICZ et al., 2015). O PRP tem como vantagens não apresentar efeitos colaterais, baixo custo de tratamento e seguro (REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2007). O PRP foi capaz de melhorar as funções ovarianas em vacas que apresentavam quadros de atividade ovariana reduzida, podendo ser explicado pela revitalização dos oócitos

quiescentes (CREMONESI et al., 2020). A relação positiva na utilização do PRP e o crescimento folicular pode ter relação com os fatores de crescimento presentes no plasma envolvido no estágio inicial do desenvolvimento dos folículos (HOSSEINI et al., 2017).

Existem protocolos manuais e protocolos automatizados para a obtenção do PRP na prática. As centrífugas como um método mais sofisticado fornece uma concentração de plaquetas em pequeno volume de plasma obtido, em torno de 2 a 5mL, porém demanda um alto custo do médico veterinário com a aquisição de máquinas próprias (SEGABINAZZI et al., 2021; CANISSO et al., 2020) . Já o método manual não requer a utilização de equipamentos especializados e veio como uma alternativa para obtenção do PRP de forma mais acessível, no entanto, para a sua aplicação intra-uterina, há uma necessidade de volume maior, entre 10 à 60mL para que seja capaz de agir em toda a superfície do endométrio (CANISSO et al., 2020). Vale lembrar que o lúmen uterino das éguas é extenso, exigindo uma maior concentração de PRP para sua eficácia. A remoção dos glóbulos vermelhos pode ser benéfica, visto que sua presença em grandes quantidades pode prejudicar os espermatozoides quando utilizado PRP intra-uterino (ANDRADE JUNIOR et al., 2020).

3 HIPÓTESES

Hipótese nula (H_0) – a utilização do plasma rico em plaquetas não foi eficaz na modulação da resposta inflamatória de éguas susceptíveis a endometrite

Hipótese alternativa (H_1) – a utilização do plasma rico em plaquetas foi eficaz na modulação da resposta inflamatória de éguas susceptíveis a endometrite

4 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é utilizar do plasma rico em plaquetas na modulação inflamatória gerada na endometrite, com o intuito de reduzir o líquido intrauterino, células polimorfonucleares e melhorar o ambiente uterino para em consequência obter resultados positivos na recuperação embrionária e gestação.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção dos animais

Foram utilizadas 15 éguas da raça Mangalarga Marchador, com peso médio de 300 a 500kg e idade entre 6 a 12 anos. Os animais pertenciam a haras particulares na região de Guarapari e Domingos Martins (Espírito Santo) no período da estação de monta de 2021/2022. Todos os animais apresentavam bom escore de condição corporal, alimentados diariamente com feno e ração ou a pasto e água *ad libitum*. As éguas foram selecionadas e classificadas como susceptíveis a endometrite de acordo com o histórico reprodutivo, avaliações ultrassonográficas e citológicas.

5.3 Confeção e utilização do PRP

O PRP foi obtido através do método manual, utilizando-se dos tubos de citrato de sódio a 3,2% com 40mL de sangue total distribuídos igualmente, coletados por punção venosa jugular com devida assepsia, através de seringas de 20mL, passando pelo processo de decantação por 1-2h em temperatura ambiente e protegidos da radiação solar. Após decantar, o conteúdo foi aspirado com uma seringa estéril dos tubos de citrato de sódio tornando-se prontos para serem infundidos através da pipeta de inseminação convencional Provar® de forma vaginal, com auxílio de uma luva de palpação transretal e lubrificante a base de água. É imprescindível que antes do processo seja feita uma correta higienização da região vulvar das éguas para que não haja nenhum tipo de contaminação uterina com fatores externos, inicialmente é feita a contenção da cauda para evitar maiores contaminações, a região foi higienizada com detergente neutro e enxaguada com água corrente por no mínimo três vezes. Após isso, a região foi seca com papel toalha descartável. A partir do procedimento, é obtido em torno de 10 à 20mL de PRP, sendo utilizado apenas a porção de plasma localizada na parte superior do tubo. É necessário que se tenha cautela no momento

da separação e coleta do material para que o mesmo não se contamine com as plaquetas que estarão localizadas na parte inferior do tubo. A aplicação do PRP foi feita 24 horas pré inseminação artificial (SEGABINAZZI et al., 2021; CANISSO et al., 2020; ANDRADE JUNIOR et al., 2020).

5.4 Inseminação artificial

A inseminação artificial foi realizada 24 horas após a infusão intrauterina de PRP. O protocolo feito utilizou-se dos indutores de ovulação GnRH (Histrelin, Botupharma®) e hCG (Rancho das Américas®), com a média de ovulação 33-36h após. As éguas tiveram suas caudas enfaixadas para minimizar o risco de contaminação, sua região perineal foi higienizada no mínimo três vezes com auxílio de sabão não residual e retirada com água corrente, posteriormente seca com papel descartável. Assim, as éguas foram inseminadas utilizando-se de pipetas de inseminação Provar®, com a responsável utilizando de luva de palpação transretal e lubrificante a base de água, inseridas via vaginal até o corpo uterino, e posteriormente confirmada à ovulação através da presença de um corpo lúteo no ovário correspondente ao folículo dominante.

5.5 Acúmulo de fluido intrauterino

Foram avaliados os acúmulos de fluido intrauterino 24 horas antes e após a inseminação artificial através de análise por ultrassonografia transretal. A presença de fluido foi registrada.

5.6 Citologia endometrial

Foi realizada a citologia endometrial através do método de lavagem de baixo volume com auxílio do Ringer Lactato, e a partir do lavado obtido confeccionou-se uma lâmina por esfregaço corada com kit panótico para avaliação das células e verificação da presença de polimorfonucleares 24h antes da inseminação e 24h após a inseminação e realização do PRP. A porcentagem de células polimorfonucleares foi determinada por 100 células epiteliais e classificados posteriormente em porcentagem de tecido

não inflamado (<5%), inflamação leve (5- <15%), moderada (>15 - <30%) e intensa (>30%) como descrito por SEGABINAZZI et al. (2017).

Para a realização do lavado de baixo volume, a cauda da égua foi enrolada para diminuir os riscos de contaminação, e a região perineal foi higienizada no mínimo três vezes com água corrente e sabão não residual. Posteriormente, a região foi seca com papel toalha descartável. Com uma luva de palpação calçada, foi introduzida a sonda de lavagem de embrião Minitube® de tamanho 28-32mm com auxílio de lubrificante a base de água via vaginal. O balão da sonda foi inflado com ar com uma seringa estéril de 20mL. Acoplada a sonda, havia um conector em Y para fazer a entrada do soro Ringer Lactato até o útero e posteriormente a saída do conteúdo para os tubos de coleta. Após o contato do soro com o útero, aguardou-se no mínimo 2 minutos para que o conteúdo atingisse a maior parte da superfície uterina e posteriormente ser retirado, manipulando o útero cuidadosamente por 30 segundos para distribuir o líquido por todo o lúmen uterino. Para esse procedimento, utilizou-se de 50-100 mL de Ringer Lactato intrauterino. Após isso, com auxílio de um swab estéril, a amostra foi coletada do tubo que já continha o soro e o conteúdo uterino e foi confeccionada uma lâmina de citologia endometrial, corada no kit panótico e analisada via microscópio.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas, bem como a confecção dos gráficos, foram realizados utilizando o software GraphPad Prism version 9.3 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA. Todos os dados analisados foram submetidos aos testes de normalidade e de homoscedasticidade. Os testes de Shapiro & Wilk e o de Kolmogorov & Smirnov avaliaram se a distribuição de probabilidade dos dados é a normal enquanto o teste de Levene avaliou a homoscedasticidade, ou seja, se distribuição dos dados são homogêneas.

Para comparação do efeito do PRP na endometrite e líquido intrauterino antes e depois foi utilizado o teste de Wilcoxon e para verificar a associação entre prenhes e presença da endometrite foi realizado o teste exato de Fisher. Foi considerado como significativo em todas as análises quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

A citologia uterina realizada pré tratamento em todas as 15 éguas resultou em 54% apresentando inflamação moderada e 46% inflamação leve, como mostra na **Figura 1**. Enquanto que após o tratamento com PRP, 67% apresentaram ausência e 34% inflamação leve.

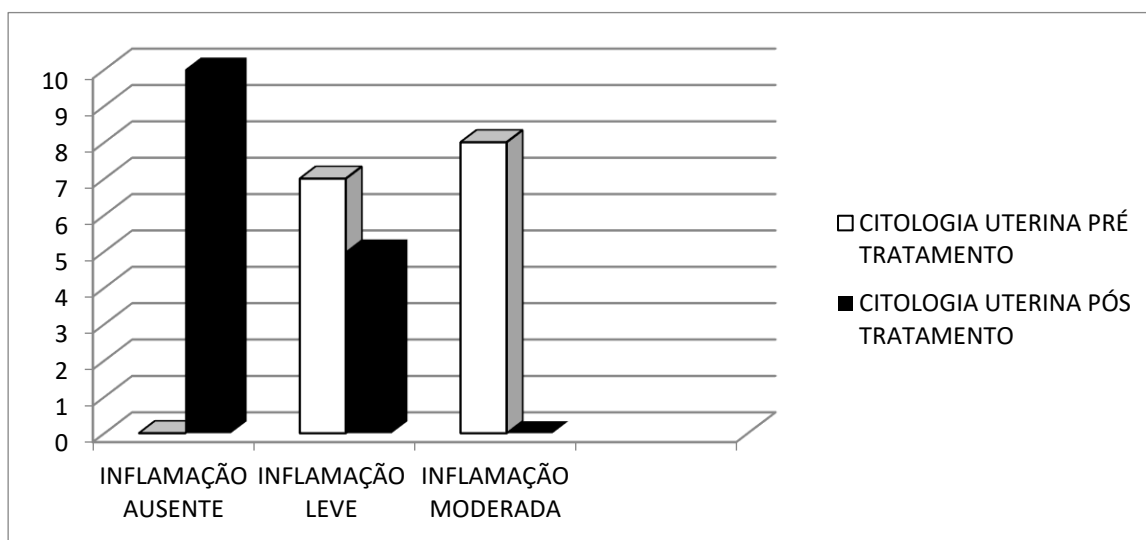
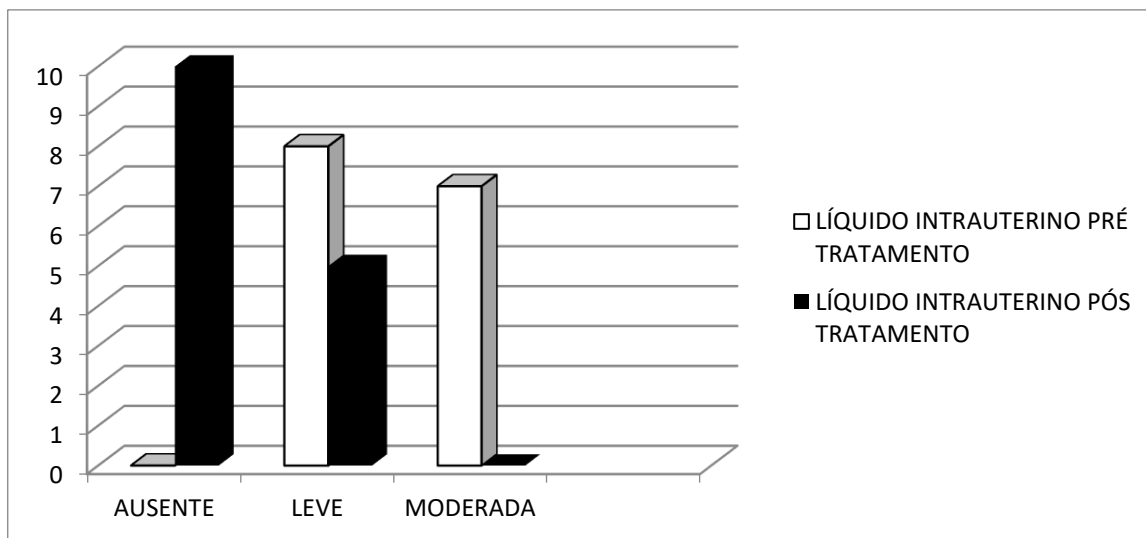


Figura 1: ANÁLISE DE CITOLOGIA UTERINA PRÉ E PÓS TRATAMENTO DE PRP DEMONSTRANDO AS TAXAS DE INFLAMAÇÃO AUSENTE, LEVE E MODERADA. DAS 15 ÉGUAS, 54% APRESENTARAM INFLAMAÇÃO MODERADA E 46% INFLAMAÇÃO LEVE PRÉ TRATAMENTO, SEM ÉGUAS COM INFLAMAÇÃO AUSENTE. PÓS PRP AS ÉGUAS APRESENTARAM 67% DE INFLAMAÇÃO AUSENTE E 34% DE INFLAMAÇÃO LEVE. NENHUM APRESENTOU INFLAMAÇÃO MODERADA.

A presença de líquido intrauterino avaliado em todas as 15 éguas mostrou que, 46% apresentaram quantidade moderada de líquido intrauterino e 54% apresentaram quantidade leve pré tratamento. Enquanto que após o tratamento com PRP, 67% apresentaram ausência e 34% de quantidade leve do líquido intrauterino, como mostra na **Figura 2**.



QUANTIDADE AUSENTE, LEVE E MODERADA. DAS 15 ÉGUAS, 46% APRESENTAVA INFLAMAÇÃO MODERADA E 54% APRESENTARAM INFLAMAÇÃO LEVE, COM NENHUMA AUSENTE. NO PÓS TRATAMENTO, 67% OBTIVERAM INFLAMAÇÃO AUSENTE E 34% INFLAMAÇÃO LEVE. NENHUMA COM INFLAMAÇÃO MODERADA.

Pode-se observar que houve diferença estatística ($P < 0,05$) nas éguas tratadas com PRP na redução das células polimorfonucleares e evolução no grau de endometrite na análise da citologia uterina pré e pós inseminação.

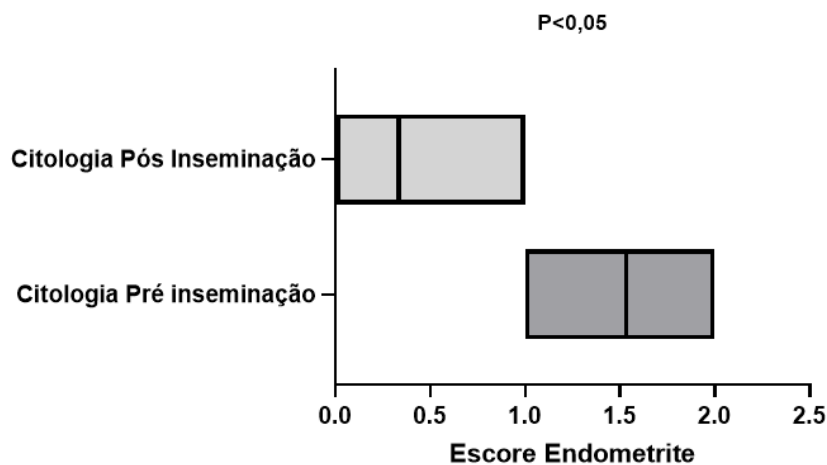


Figura 3: ESCORE DE ENDOMETRITE E CITOLOGIA PRÉ E PÓS INSEMINAÇÃO E TRATAMENTO DAS ÉGUAS ACOMETIDAS POR ENDOMETRITE

Pode-se observar que houve significância estatística ($P < 0,05$) nas éguas tratadas com PRP na redução do líquido intrauterino.

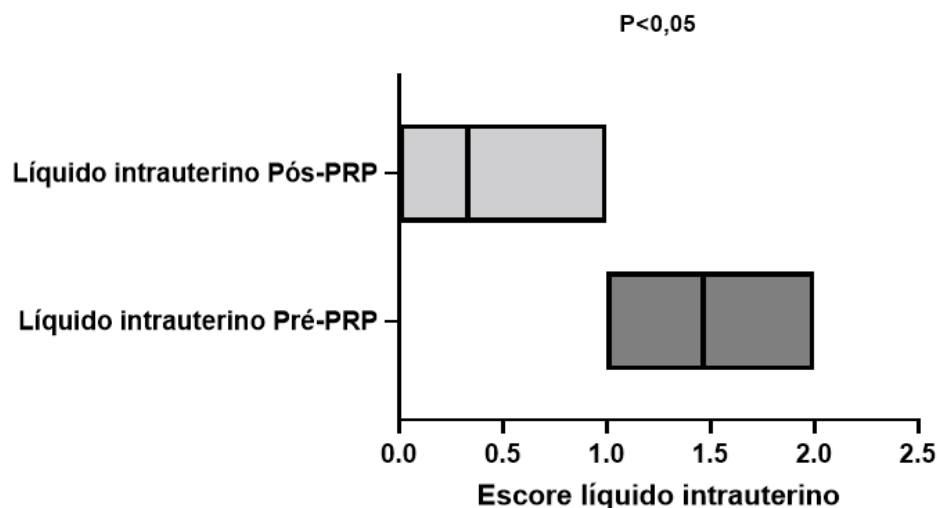


Figura 4: ESCORE DE LÍQUIDO INTRAUTERINO ASSOCIADO AO PRÉ E PÓS PRP NAS ÉGUAS ACOMETIDAS POR ENDOMETRITE

Ao comparar a taxa de prenhez pós tratamento nas éguas que cessaram a inflamação e as éguas que permaneceram com grau leve inflamatório, mesmo com o uso do PRP mostra que com a inflamação leve a taxa de prenhez positiva foi de 13,3% e quando a inflamação estava ausente a taxa subia para 46,6%. Nas taxas de prenhez negativa, ambas tiveram 20% mesmo com inflamação leve e ausente, como mostra na **Figura 5**.

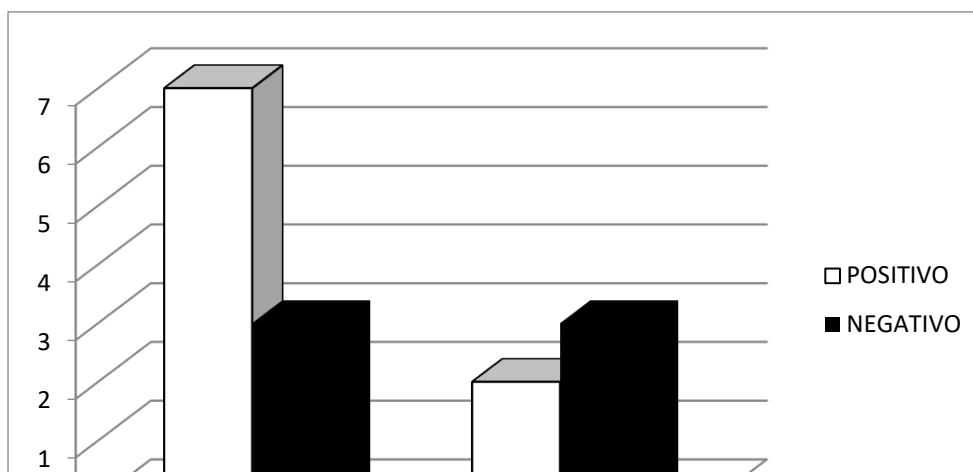


Figura 5: TAXA DE PREENHEZ POSITIVA E NEGATIVA DE ACORDO COM A INFLAMAÇÃO AUSENTE E LEVE NO TRATAMENTO PÓS PRP. DAS 15 ÉGUAS, 13,3% OBTIVERAM PREENHEZ POSITIVA NA PRESENÇA DE INFLAMAÇÃO LEVE E 46,6% DE PREENHEZ POSITIVA NA AUSÊNCIA DE INFLAMAÇÃO.

Na avaliação da taxa de prenhez positiva e negativa após o tratamento com PRP, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) nos resultados quando as éguas ainda apresentavam inflamação leve mesmo tratadas e nos resultados quando a inflamação foi cessada. As éguas prenhes que foram tratadas e obtiveram ausência de inflamação resultaram de forma positiva nas taxas de prenhez se comparada com as vazias. As éguas que evoluíram de uma inflamação moderada ou leve para inflamação leve mesmo no pós- tratamento, ou seja, não tiveram sua inflamação cessada por completo, tiveram taxas baixas de resultado positivo na prenhez, mostrando que o índice de gestantes foi menor quando a inflamação não foi cessada por completo quando comparada com o índice de prenhez a partir da ausência completa de inflamação com o uso do PRP.

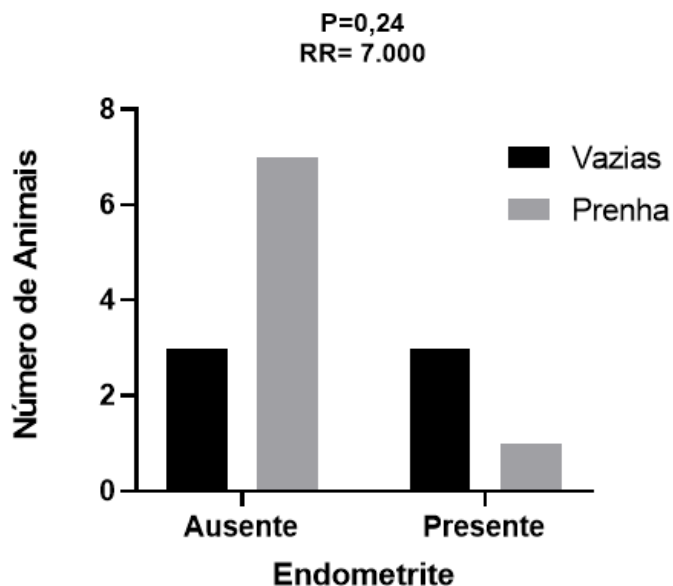


Figura 6: COMPARATIVO ENTRE O GRAU DE ENDOMETRITE AUSENTE E PRESENTE NO RESULTADO DE ÉGUAS PRENHES E VAZIAS.

Correlacionando a taxa de líquido intrauterino presente e ausente após o tratamento com PRP, nota-se que quando o líquido intrauterino estava presente, mesmo que em quantidade leve, a porcentagem de resultados positivos foi de 13,3%, já o de negativo foi de 20%. Quando o líquido intrauterino apresentava-se ausente, a taxa de positivos foi para 46% e a taxa de negativos para 20%, visto na **Figura 7**.

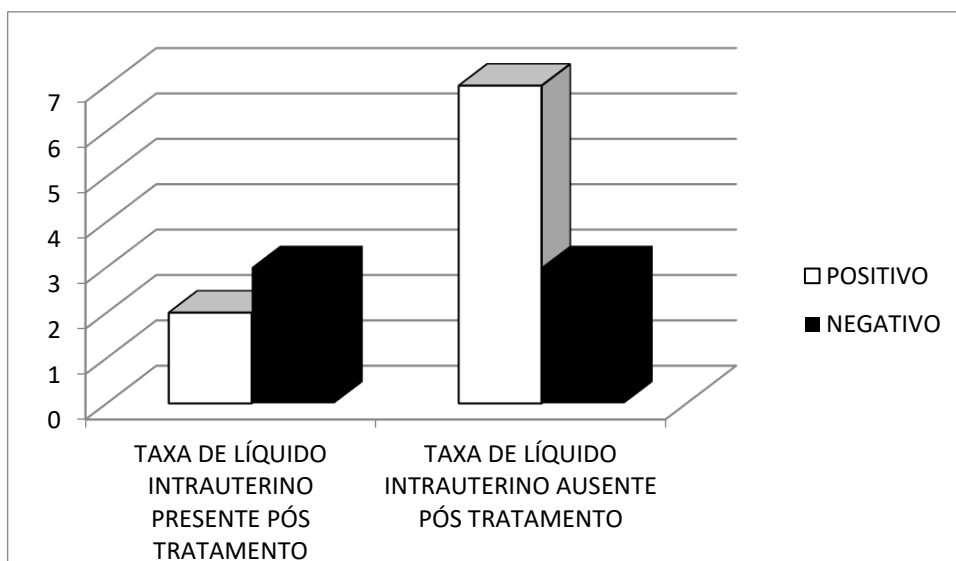


Figura 7: COMPARATIVO ENTRE A TAXA DE POSITIVO E NEGATIVO NA PREENHEZ DE ÉGUAS QUE APRESENTAVAM TAXA DE LÍQUIDO INTRAUTERINO PRESENTE E AUSENTE NO PÓS TRATAMENTO COM PRP. DAS 15 ÉGUAS, 13,3% OBTIVERAM PREENHEZ POSITIVA NA PRESENÇA DE LÍQUIDO, JÁ NA AUSÊNCIA TOTAL DO LÍQUIDO INTRAUTERINO O ÍNDICE DE POSITIVO FOI PARA 46%.

Na presença do líquido intrauterino, as éguas que apresentaram ausência completa correlacionando a prenhez positiva tiveram uma melhora significativa no índice (**Figura 8**), e as éguas que ainda apresentavam algum grau de líquido presente mesmo tratando com PRP também apresentaram melhora significativa no índice da prenhez comparando com o resultado negativo.

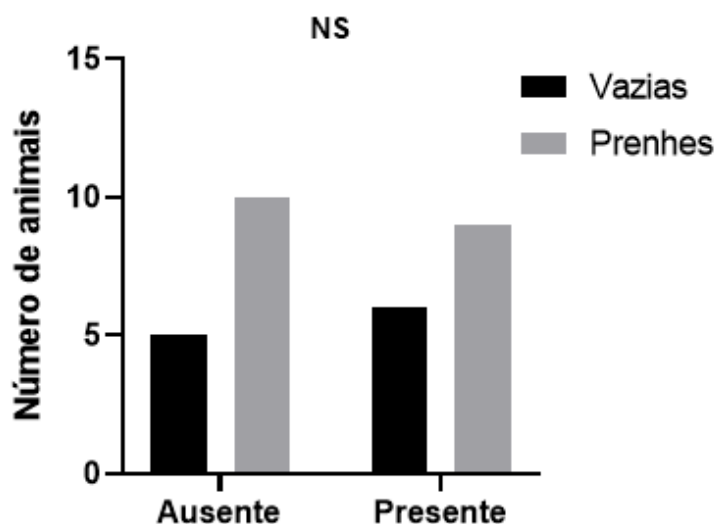


Figura 8: COMPARATIVO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE LÍQUIDO INTRAUTERINO NA TAXA DE PREENHEZ POSITIVA E NEGATIVA.

7 DISCUSSÃO

A endometrite é classificada como a primeira doença causadora da subfertilidade no plantel de éguas destinadas à reprodução, considerando que em torno de 25-60% desses animais que não apresentam resultados positivos de prenhez ou recuperação embrionária possuem quadros de infecção ou inflamação uterina (CANISSO et al., 2020).

O presente estudo mostrou que éguas susceptíveis a endometrite iniciam os sinais da inflamação com acúmulo de líquido intrauterino e presença de células polimorfonucleares. A inflamação presente pode ser ocasionada por um déficit na depuração uterina, na qual os danos aos vasos sanguíneos e às glândulas uterinas levam a uma diminuição da drenagem linfática e circulação uterina (HOFFMANN et al., 2009; GRUNINGER et al., 1998). As éguas consideradas susceptíveis apresentam uma resposta inflamatória uterina prolongada e um início da modulação inflamatória tardia, prejudicando a sobrevivência do embrião (CARNEVALE, et al., 2000; BUCCA et al., 2008; WOODWARD et al., 2013).

É válido ressaltar que as éguas susceptíveis podem apresentar idade mais avançada, conformação vulvar inadequada, útero pendular (TRAUB-DARGATZ, 1991; TROEDSSON, 1999; LEBLANC et al., 1994; TROEDSSON et al., 1994; SCOGGIN, 2015; WOODWARD et al., 2012, CUERVO-ARANGO, 2019) e frequência, duração e intensidade baixas de contrações miométrais que auxiliam na limpeza física uterina (TROEDSSON, 1993), demonstrando uma falha na defesa uterina fisiológica, possivelmente ocasionada nas mudanças de liberação de ocitocina e prostaglandinas (RIGBY et al., 2001).

O diagnóstico da endometrite é multimodal em conjunto com o histórico reprodutivo da égua, envolvendo avaliação ultrassonográfica, cultura e citologia endometrial, e também biópsia. A citologia endometrial é utilizada para avaliação da quantidade e do tipo de células inflamatórias comparada com as células epiteliais endometriais do lúmen uterino (NIELSEN, 2005; FERRIS, 2015; COCCHIA et al., 2012). O lavado de baixo volume se torna positivo no diagnóstico da endometrite por atingir toda a superfície uterina, não sendo focal como quando utiliza-se a escova citológica,

permitindo uma coleta mais fidedigna de células, porém também há o risco de contaminação com microrganismos do trato reprodutivo caudal (RIDDLE, 2007; CANISSO, 2016). A ultrassonografia é um importante aliado no diagnóstico da endometrite para avaliação do acúmulo de líquido intrauterino. Mas, é valido ressaltar que, nem todas as éguas que possuem quadros de endometrite apresentam acúmulo de líquido, podendo gerar um falso negativo. Isso nos mostra que a ultrassonografia é complementar aos outros exames que precisam ser realizados para o diagnóstico conclusivo (LEBLANC, 2009; OVERBECK, 2011).

Nos resultados obtidos, as éguas apresentaram inflamação moderada à leve de acordo com a citologia uterina e a contagem de neutrófilos, classificadas seguindo SEGABINAZZI et al. (2017). Das quinze éguas, 53% apresentaram inflamação moderada e 46,6% inflamação leve na idade entre 6 a 12 anos. No relato de CARLUCCIO et al. (2020), 38% das suas éguas classificadas para o estudo apresentavam inflamação leve e 62% apresentavam inflamação moderada, utilizando-se de éguas entre 3 a 21 anos. É possível identificar que, as éguas mais velhas apresentavam inflamações moderadas, enquanto que as éguas mais jovens apresentaram maior taxa de inflamação leve. Corroborando com o estudo de CARLUCCIO et al. (2020), em que as éguas com idade média de 9 anos também apresentaram maiores taxas de inflamação moderada. Isso nos mostra que o avançar da idade das éguas predispõe a maiores chances de endometrite, gerando queda na eficiência reprodutiva e relacionando de forma direta a fertilidade, avanço da idade e endometrite (CUERVO-ARANGO, 2019).

Nas éguas tratadas com o PRP, notou-se a capacidade na redução de neutrófilos presentes no lúmen uterino analisados na citologia 24h pós inseminação. METCALF (2012) explica esse fato de acordo com os efeitos anti inflamatórios presentes no PRP, através de uma regulação das citocinas pró inflamatórias, aumentando também as taxas de fertilidade em consequência ao uso (METCALF, 2014). De acordo com PASCH (2021) também houve uma redução dos neutrófilos em seu estudo após o tratamento com PRP avaliados por citologia endometrial. Para as éguas tratadas, a citologia uterina alterou-se positivamente, a inflamação moderada foi cessada, apenas 33% das éguas apresentaram a inflamação leve e por fim 66,6% das éguas com inflamação ausente.

Os resultados demonstraram que o fluido intrauterino analisado via exame ultrassonográfico estava presente 24h antes da inseminação, condizendo o que diz TROEDSSON (1998) que relatou éguas com acúmulo de cerca de seis vezes mais fluido uterino quando susceptíveis a endometrite. Das 15 éguas, 46,6% apresentaram quantidade moderada e 53% quantidade leve avaliadas via ultrassonografia pré tratamento. A partir da utilização do PRP, 33% permaneceram com leve líquido intrauterino e 66,6% das éguas apresentaram ausência completa avaliadas via ultrassonografia. REGHINI (2016) demonstra esse resultado também em seu estudo, correlacionando o efeito benéfico do plasma rico em plaquetas sob o processo inflamatório. Para as éguas que permaneceram com a presença de líquido intrauterino mesmo após o tratamento pode-se relacionar com conformação vulvar inadequada e útero pendular com processo falho na eliminação de sujidades, além da baixa capacidade de contrações miométrais para auxílio da limpeza uterina, predispondo a um contínuo processo inflamatório. (TRAUB-DARGATZ, 1991; TROEDSSON, 1999; LEBLANC et al., 1994; TROEDSSON et al., 1994; SCOGGIN, 2015; WOODWARD et al., 2012, CUERVO-ARANGO, 2019; TROEDSSON, 1993).

PASCH (2021) também relatou diminuição ou ausência de líquido intrauterino pós tratamento. SEGABINAZZI et al. (2017) realizou infusões intrauterinas de PRP 24h antes da inseminação artificial juntamente com a citologia endometrial e encontrou resultados positivos na diminuição das células polimorfonucleares, diminuição ou ausência de líquido intrauterino e maiores taxas de éguas gestantes e recuperações embrionárias, constatando também com os resultados do presente estudo.

Ao analisar os dados de prenhez após o tratamento com PRP, das 15 éguas, 60% obtiveram prenhez positiva condizendo com os resultados de METCALF (2014), e dentro dessa taxa de resultados, 46% esta diretamente relacionada às éguas tratadas com PRP e apresentando inflamação ausente na citologia, e também com ausência de líquido intrauterino, mostrando que o processo inflamatório foi debelado por completo com a ação anti-inflamatória do PRP nessas éguas.

As éguas que ainda apresentaram quantidade leve de líquido intrauterino e citologia com inflamação leve pós PRP, dos 60% totais, 20% representam os resultados positivos. A presença da inflamação mesmo após o tratamento gera uma queda nas taxas de positivo, devido a um ambiente hostil para a sobrevivência do embrião e

manutenção de uma gestação (CARNEVALE, et al., 2000; BUCCA et al., 2008; WOODWARD et al., 2013). Isso é possível de ser visualizado ao compararmos os resultados das éguas que apresentaram um processo inflamatório driblado por sua totalidade e apresentaram mais que o dobro de resultados positivos quando comparado com as éguas que não tiveram a inflamação debelada por completo.

Para os resultados negativos, de forma geral, além do processo inflamatório ainda presente, podemos atribuir outros fatores que influenciam como idade da égua, qualidade do oócito, qualidade seminal, tipo de sêmen utilizado, manejo, conformação vulvar, e capacidade de *clearence* uterino (DELL'AGUA JR., 2004; WOODWARD et al., 2012; CARD, 2005).

De acordo com CARLUCCIO et al. (2020), a taxa de prenhez pós utilização do PRP foi de 54% das éguas tratadas, sendo dessas éguas 38% apresentando endometrite leve a moderada. Também de acordo com CARLUCCIO et al. (2020), foi visto que a taxa de prenhez reduziu quando encontrada inflamação moderada, totalizando 43%, comparada com a inflamação leve em que a taxa era maior, de 65% de positivos. No presente estudo, a taxa de prenhez positiva após o tratamento com PRP foi de 46% na ausência da inflamação, já quando a égua ainda apresentava um grau de inflamação leve levando em consideração a citologia uterina, a taxa de prenhez caía para 13%. Isso também é possível observar quando analisamos a presença de líquido intrauterino após o tratamento, resultando em uma taxa de 13% de positivo, contrastando na ausência de processo inflamatório completo em que a taxa subia para 46%. O estudo feito por CARLUCCIO et al. (2020) mostrou que éguas apresentando inflamações leves tiveram maiores chances de gestações positivas do que as éguas que apresentaram inflamação moderada, corroborando também com esse estudo. Para DAWOD et al. (2021), a taxa de prenhez após o tratamento com PRP teve uma melhora de 50% nos resultados positivos. METCALF (2014) também obteve taxas significativamente altas de éguas gestantes pós tratamento com uma redução significativa de líquido intrauterino. Para PASCH (2021), a taxa de prenhez teve uma melhora de 50% após o tratamento.

Apesar de não ter tido diferença estatística ($P < 0,05$) nos resultados negativos de prenhez com ausência e a presença da inflamação mesmo após o tratamento com PRP, as éguas prenhes que foram tratadas com PRP e obtiveram ausência de

inflamação resultaram de forma positiva se comparada com as vazias. As éguas que evoluíram de uma inflamação moderada ou leve para inflamação leve mesmo no tratamento com PRP, ou seja, ainda presente um nível de inflamação, tiveram resultado inverso na prenhez positiva, mostrando que o índice de prenhez foi menor quando a inflamação não foi cessada por completo quando comparada com o índice de prenhez a partir da ausência completa de inflamação com o uso do PRP, justificando o dito por METCALF (2014), que relata que ao controlar o nível inflamatório uterino com redução do líquido intrauterino, mesmo que não cessado, redução de citocinas pró inflamatórias, quantidade de neutrófilos presentes na citologia e melhora de um ambiente uterino após o uso do PRP, há uma maior taxa de sobrevivência embrionária e prenhez positiva. Para um melhor resultado desse estudo, o número de éguas susceptíveis a endometrite e tratadas com PRP deveria ser maior, justificando que a diferença estatística pode mudar de cenário quando se apresenta maiores resultados com maior número de animais tratados.

De acordo com os efeitos negativos do PRP e suas desvantagens, pode-se afirmar que a utilização é totalmente segura e os riscos são mínimos da disseminação de doenças ou de respostas alérgicas/imunogênicas que a égua pode apresentar, já que o seu preparo é de forma autóloga (EVERTS et al., 2006). DEHGHANI et al. (2018) mostrou em seu estudo que a utilização do PRP não gerou efeito negativo nos ovários e nas estruturas reprodutivas de ratas.

A escolha pelo lavado de baixo volume visa atingir uma superfície uterina maior e consequente coleta de material mais fidedigna de um órgão por inteiro, visto que a escova citológica é também um método barato e rápido porém apenas um segmento do útero é coletado, ou seja, uma amostra local, fazendo com que o resultado possa se tornar infiel de acordo com o acometimento uterino (RIDDLE, 2007; CANISSO, 2016).

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos diante desse trabalho sugere-se que a utilização do plasma rico em plaquetas é eficaz no tratamento da endometrite, modificando o cenário inflamatório e melhorando a citologia uterina e a presença de líquido intrauterino. Em consequência, a taxa de prenhez aumentou quando a endometrite foi cessada pós tratamento. A utilização do PRP é rápida, barata e eficaz, não havendo contraindicações no seu uso devido a sua confecção autóloga. A utilização do plasma vem como uma alternativa aos tratamentos convencionais existentes que muitas vezes não apresentam resultados benéficos. O diagnóstico e o tratamento correto da endometrite é de suma importância, visto que é uma afecção que acomete os plantéis de éguas doadoras de embrião e as selecionadas para protocolos de prenhez, gerando perdas econômicas ao criador quando não solucionada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alghamdi AS, Foster DN, Carlson CS, Troedsson MH. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Am J Reprod Immunol*. 2005 May;53(5):230-7. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00270.x. PMID: 15833101.

Alghamdi A, Troedsson MH, Laschkewitsch T, Xue JL. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology*. 2001 Mar 1;55(4):1019-28. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00462-9.

Canisso IF, Stewart J, Coutinho da Silva MA. Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2016 Dec;32(3):465-480. doi: 10.1016/j.cveq.2016.08.004. PMID: 27810036.PMID: 11291908.

Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jun 7;4(3):67. doi: 10.1186/scrt218. PMID: 23759113; PMCID: PMC3706762.

Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Dec;9(12):721-30. doi: 10.1038/nrrheum.2013.141. Epub 2013 Oct 1. PMID: 24080861.

Angulo J, Wright HM, Cuevas P, González-Corrochano R, Fernández A, Cuevas B, La Fuente JM, Gupta S, Sáenz de Tejada I. Nebivolol dilates human penile arteries and reverses erectile dysfunction in diabetic rats through enhancement of nitric oxide signaling. *J Sex Med*. 2010 Aug;7(8):2681-97. doi: 10.1111/j.1743-6109.2010.01710.x. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20214719.

Beltaire KA, Cheong SH, Coutinho da Silva MA. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999-2011). *Equine Vet J Suppl*. 2012 Dec;(43):84-7. doi: 10.1111/j.2042-3306.2012.00608.x. PMID: 23447884.

Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P, Desiderio MA. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF. *J Cell Physiol*. 2010 Nov;225(3):757-66. doi: 10.1002/jcp.22274. PMID: 20568106.

Boerboom D, Brown KA, Vaillancourt D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K, Doré M, Sirois J. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biol Reprod*. 2004 Feb;70(2):391-9. doi: 10.1095/biolreprod.103.020800. Epub 2003 Oct 15. PMID: 14561653.

Brinsko SP, Rigby SL, Varner DD, Blanchard TL. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. In *AAEP Proc*. 2003; 49: 363-365.

Bucca S, Carli A, Buckley T, Dolci G, Fogarty U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*. 2008 Oct 15;70(7):1093-100. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.029. Epub 2008 Jul 22. PMID: 18649933.

Burleson MD, LeBlanc MM, Riddle WT, Hendricks KEM. Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. *Anim Reprod Sci Suppl*. 2010; 121: 103.

Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*. 1991.

Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*. 2000 Oct 1;54(6):965-79. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00405-2. PMID: 11097048.

Cadario ME, Thatcher MJD, Leblanc MM. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Biol. Reprod*. 1995, 52, 495–500.

Canisso IF, Stewart J, Coutinho da Silva MA. Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2016 Dec;32(3):465-480. doi: 10.1016/j.cveq.2016.08.004. PMID: 27810036.

Card C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*. 2005 Aug;64(3):580-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.041. PMID: 15978660.

Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*. 2000 Oct 1;54(6):965-79. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00405-2. PMID: 11097048.

Cieslik-Bielecka A, Bielecki T, Gazdzik TS, Arendt J, Król W, Szczepanski T. Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury. *Transfus Apher Sci*. 2009 Aug;41(1):9-12. doi: 10.1016/j.transci.2009.05.006. Epub 2009 Jun 12. PMID: 19524487.

Cremonesi F, Bonfanti S, Idda A, Lange-Consiglio A. Platelet Rich Plasma for Regenerative Medicine Treatment of Bovine Ovarian Hypofunction. *Front Vet Sci*. 2020 Aug 13;7:517. doi: 10.3389/fvets.2020.00517. PMID: 32903508; PMCID: PMC7438405.

Cronin JG, Turner ML, Goetze L, Bryant CE, Sheldon IM. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod*. 2012 Feb 29;86(2):51. doi: 10.1095/biolreprod.111.092718. PMID: 22053092; PMCID: PMC4396703.

Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA. A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. *Theriogenology*. 2019 Jul 1;132:36-44. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.04.010. Epub 2019 Apr 8. PMID: 30986613.

Cundell DR, Mickle KE. Osteoarthritis: potential for herbal medicines as therapies in the management of chronic inflammatory damage. *Curr Immunol Rev*. 2018; 14(2):68–80. doi:10.2174/1573395514666180530093702.

Dascanio JJ. How and when to treat endometritis with systemic or local antibiotics. In: *Proceedings of the 57th Annual Convention of the American Association of Equine*

Practitioners, San Antonio, Texas, USA, 18-22 November 2011. American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2011:24-31.

Dellaqua JA. Efeito da cortico-terapia e plasma seminal na resposta inflamatória e fertilidade de éguas submetidas à inseminação artificial. Botucatu, 2004. 120p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Dehghani F, Aboutalebi H, Esmaeilpour T, Panjehshahin MR, Bordbar H. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on ovarian structures in cyclophosphamide-induced ovarian failure in female rats: a stereological study. *Toxicol Mech Methods*. 2018 Nov;28(9):653-659. doi: 10.1080/15376516.2018.1491662. Epub 2018 Oct 16. PMID: 29968488.

Demir R, Yaba A, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochem*. 2010 May;112(3):203-14. doi: 10.1016/j.acthis.2009.04.004. Epub 2009 May 29. PMID: 19481785.

England G. Fertility and Obstetrics in the Horse. John Wiley & Sons, 2008.

Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, Box HA, van Zundert A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006 Jun;38(2):174-87. PMID: 16921694; PMCID: PMC4680757.

Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology*. 1991 Nov;36(5):823-30. doi: 10.1016/0093-691x(91)90348-h. PMID: 16727051.

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

Ferris RA. Bacterial endometritis: A focus on biofilms. *Clin. Theriogenology* 2014, 6, 3 15–319.

Ferris RA, Bohn A, McCue, PM. Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. *Equine Vet. Educ*. 2015, 27, 316–322

Friso, A.M.; Segabinazzi, L.G.T.M.; Cyrino, M.; Correal, S.B.; FreitasDell'Aqua, C.P.; Teoro do Carmo, M.;Dell'Aqua, J.A.; Miró, J.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A. Periovalutary administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. *Theriogenology* 2019, 138, 24– 30.

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.* 2008 Feb;84(1):1-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.02.008. Epub 2007 Apr 16. PMID: 17434193.

Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007 Jul 15;118(1-2):30-9. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.04.009. Epub 2007 May 3. PMID: 17559943.

Garor R, Abir R, Erman A, Felz C, Nitke S, Fisch B. Effects of basic fibroblast growth factor on in vitro development of human ovarian primordial follicles. *Fertil Steril.* 2009 May;91(5 Suppl):1967-75. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.04.075. Epub 2008 Aug 9. PMID: 18692802.

Girling JE, Hedger MP. Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunol Cell Biol.* 2007 Aug-Sep;85(6):481-9. doi: 10.1038/sj.icb.7100086. Epub 2007 Jun 26. PMID: 17592495.

Gargett CE, Nguyen HP, Ye L. Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev Endocr Metab Disord.* 2012 Dec;13(4):235-51. doi: 10.1007/s11154-012-9221-9. PMID: 22847235.

Hajipour H, Nejabati HR, Latifi Z, Hamdi K, Bahrami-Asl Z, Fattahi A, Nouri M. Lymphocytes immunotherapy for preserving pregnancy: Mechanisms and Challenges. *Am J Reprod Immunol.* 2018 Sep;80(3):e12853. doi: 10.1111/aji.12853. Epub 2018 Mar 31. PMID: 29603821.

Hessel LN, Bosch G, van Weeren PR, Ionita JC. Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems. *Equine Vet J.* 2015 May;47(3):319-25. doi: 10.1111/evj.12288. Epub 2014 Jun 11. PMID: 24773596.

Hosseini L, Shirazi A, Naderi MM, Shams-Esfandabadi N, Borjian Boroujeni S, Sarvari A, Sadeghnia S, Behzadi B, Akhondi MM. Platelet-rich plasma promotes the development of isolated human primordial and primary follicles to the preantral stage. *Reprod Biomed Online*. 2017 Oct;35(4):343-350. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.04.007. Epub 2017 May 15. PMID: 28756131.

Katila T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol. Reprod*. 1995, 52, 515–517.

Kim HJ, Yeom JS, Koh YG, Yeo JE, Kang KT, Kang YM, Chang BS, Lee CK (2014) Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1. *J Orthop Res* 32: 551-556

Knight PG, Glister C. 2006. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 132(2):191–206

Kosaka N, Sudo N, Miyamoto A, Shimizu T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 23;363(3):733-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.061. Epub 2007 Sep 24. PMID: 17904528.

LeBlanc MM, Neuwirth L, Asbury AC, Tran T, Mauragis D, Klapstein E. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Vet J*. 1994 Mar;26(2):109-13. doi: 10.1111/j.2042-3306.1994.tb04346.x. PMID: 8575370.

LeBlanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Domest Anim*. 2009 Sep;44 Suppl 3:10-22. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x. PMID: 19660076.

Lopez C, Carmona JU, Samudio I. Use of autologous platelet concentrates as treatment for a scapular fracture and brachial plexus nerve injury produced by a gunshot in a horse. *Arch Med Vet* 42. 2010: 209-214.

Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001 Jan;9(1):34-9. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2. PMID: 11166241.

Marini MG, Perrini C, Esposti P, Corradetti B, Bizzaro D, Riccaboni P, Fantinato E, Urbani G, Gelati G, Cremonesi F. 2016. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 14(1):58. doi:10.1186/s12958-016-0195-4.

Matsumoto H, Nasu K, Nishida M, Ito H, Bing S, Miyakawa I. 2005. Regulation of proliferation, motility, and contractility of human endometrial stromal cells by platelet-derived growth factor. *J Clin Endocrinol Metab*. 90(6):3560–3567. doi:10.1210/jc.2004-1918.

Mazzocca AD, McCarthy MB, Intravia J, Beitzel K, Apostolakos J, Cote MP, Bradley J, Arciero RA. An in vitro evaluation of the anti-inflammatory effects of platelet-rich plasma, ketorolac, and methylprednisolone. *Arthroscopy*. 2013 Apr;29(4):675-83. doi: 10.1016/j.arthro.2012.12.005. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23395471.

Metcalf ES, Scoggin K, Troedsson MHT. The effect of platelet-rich plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following semen deposition (Abstract). *Journal of Equine Veterinary Science* 2012; 32: 498.

Metcalf ES. The effect of platelet-rich plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis (PMIE). *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 1, n. 34, p. 128, 2014.

Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg*. 2004 May;187(5A):65S-70S. doi: 10.1016/S0002-9610(03)00306-4. PMID: 15147994.

Muir SM, Reisbig N, Baria M, Kaeding C, Bertone AL. The Concentration of Plasma Provides Additional Bioactive Proteins in Platelet and Autologous Protein Solutions. *Am J Sports Med*. 2019 Jul;47(8):1955-1963. doi: 10.1177/0363546519849671. Epub 2019 May 24. PMID: 31125271.

Neely DP, Kindahl H, Stabenfeldt GH, Edqvist LE, Hughes JP. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. *J Reprod Fertil Suppl*. 1979;(27):181-9. PMID: 289787.

Nielsen JM. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*. 2005 Aug;64(3):510-8. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.034. PMID: 15978661.

Nilsson EE, Detzel C, Skinner MK. 2006. Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction*. 131(6):1007–1015.

Opneja A, Kapoor S, Stavrou EX. 2019. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb Res*. 179:56–63. doi:10.1016/j.thromres.2019.05.001.

Pietramaggiori G, Kaipainen A, Ho D, Orser C, Pebley W, Rudolph A, Orgill DP. Trehalose lyophilized platelets for wound healing. *Wound Repair Regen*. 2007 Mar-Apr;15(2):213-20. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00207.x. PMID: 17352753.

Reghini MF, Ramires Neto C, Segabinazzi LG, Castro Chaves MM, Dell'Aqua Cde P, Bussiere MC, Dell'Aqua JA Jr, Papa FO, Alvarenga MA. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology*. 2016 Jul 15;86(2):516-22. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.029. Epub 2016 Feb 18. PMID: 27020400.

Risco AM, Reilas T, Muilu L, Kareskoski M, Katila T. Effect of oxytocin and flunixin meglumine on uterine response to insemination in mares. *Theriogenology*. 2009 Dec;72(9):1195-201. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.07.012. Epub 2009 Sep 26. PMID: 19783032.

Riddle WT, LeBlanc MM, Stromberg AJ. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*. 2007 Aug;68(3):395-402. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.050. Epub 2007 Jun 21. PMID: 17583785.

Rigby SL, Barhoumi R, Burghardt RC, Colleran P, Thompson JA, Varner DD, Blanchard TL, Brinsko SP, Taylor T, Wilkerson MK, Delp MD. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biol Reprod*. 2001 Sep;65(3):740-7. doi: 10.1095/biolreprod65.3.740. PMID: 11514336.

Robertson SA, Chin PY, Femia JG, Brown HM. Embryotoxic cytokines-Potential roles in embryo loss and fetal programming. *J Reprod Immunol*. 2018 Feb;125:80-88. doi: 10.1016/j.jri.2017.12.003. Epub 2017 Dec 27. PMID: 29306096.

Scoggin CF. Not just a number: effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in thoroughbred brood-mares. *Reprod Fertil Dev*. 2015 Jul;27(6):872-9. doi: 10.1071/RD14390. PMID: 25786411.

Scoggin CF. Endometritis: Nontraditional Therapies. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2016 Dec;32(3):499-511. doi: 10.1016/j.cveq.2016.08.002. Epub 2016 Oct 8. PMID: 27726985.

Segabinazzi LGTM, Podico G, Rosser MF, Nanjappa SG, Alvarenga MA, Canisso IF. Three Manual Noncommercial Methods to Prepare Equine Platelet-Rich Plasma. *Animals (Basel)*. 2021 May 21;11(6):1478. doi: 10.3390/ani11061478. PMID: 34063777; PMCID: PMC8223772.

Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho AM, Dell'Aqua JA Jr, Miró J, Papa FO, Alvarenga MA. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology*. 2017 Dec;104:120-126. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.08.007. Epub 2017 Aug 12. PMID: 28822903.

Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol*. 2006 Jun 12;6:53. doi: 10.1186/1471-2180-6-53. PMID: 16768798; PMCID: PMC1557402.

Silva JR, van den Hurk R, de Matos MH, dos Santos RR, Pessoa C, de Moraes MO, de Figueiredo JR. 2004. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*. 61(9):1691–1704

Stoikos CJ, Harrison CA, Salamonsen LA, Dimitriadis E. 2008. A distinct cohort of the TGF β superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization. *Human reproduction*. 23(6):1447–1456

Squires EL. Embryo transfer challenges and perspectives. *Rev. Bras. Reprod. Anim*. 2013, 37, 105–107.

Tizard, I.R. Innate immunity: The recognition of invaders. In Vet. Immunol., 9th ed.; Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 2009; Volume 1, pp. 11–20.

Tizard IR. Innate Immunity: The Recognition of Invaders. In: Tizard I.R. Veterinary Immunology. 8 Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2008; 2: 11-27

Traub-Dargatz JL, Salman MD, Voss JL. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. J Am Vet Med Assoc. 1991 May 15;198(10):1745-7. PMID: 2071472.

Troedsson MH. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. Theriogenology. 1999 Aug;52(3):461-71. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00143-0. PMID: 10734380.

TroedssonMH. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. Pferdeheilkunde 1997, 13, 516–520

Troedsson MH, Liu IK, 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. J Reprod Fertil. 1993 Nov;99(2):307-13. doi: 10.1530/jrf.0.0990307. PMID: 8107011.

Troedsson MHT, Liu IKM, Ing M, Pascoe J. Smooth muscle electrical activity in the oviduct, and the effect of oxytocin, prostaglandin F_{2α}, and prostaglandin E₂ on the myometrium and the oviduct of the cycling mare. Biol. Reprod. 1995, 52, 475–488

Troedsson MH, Desvouses A, Macpherson ML, Pozor MP. Persistent breeding-induced endometritis. Pferdeheilkunde. 2008; 24(1), 56.

Troedsson MH, Liu IK, Crabo BG. Sperm transport and survival in the mare. Theriogenology. 1998 Apr 1;49(5):905-15. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00040-5. Corrected and republished in: Theriogenology. 1998 Oct 1;50(5):807-18. PMID: 10732099.

Ulbin-Figlewicz N, Jarmoluk A, Marycz K. Antimicrobial activity of low-pressure plasma treatment against selected foodborne bacteria and meat microbiota. Ann Microbiol.

2015;65(3):1537-1546. doi: 10.1007/s13213-014-0992-y. Epub 2014 Nov 19. PMID: 26273240; PMCID: PMC4529465.

von Reitzenstein M, Callahan MA, Hansen PJ, LeBlanc MM. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. *Theriogenology*. 2002 Sep;58(5):887-98. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00847-6. PMID: 12212889.

Vanderwall DK, Woods GL. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. *J Am Vet Med Assoc*. 2003 Apr 15;222(8):1108-10. doi: 10.2460/javma.2003.222.1108. PMID: 12710775.

Wang X, Liu L, Mou S, Zhao H, Fang J, Xiang Y, Zhao T, Sha T, Ding J, Hao C. Investigation of platelet-rich plasma in increasing proliferation and migration of endometrial mesenchymal stem cells and improving pregnancy outcome of patients with thin endometrium. *J Cell Biochem*. 2019 May;120(5):7403-7411. doi: 10.1002/jcb.28014. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30506864.

Walter J, Neuberger KP, Failing K, Wehrend A. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Anim Reprod Sci*. 2012 Jun;132(3-4):178-86. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.012. Epub 2012 May 28. PMID: 22727031.

Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Squires EL, Troedsson MH. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*. 2012 Aug;78(3):495-501. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.028. Epub 2012 Apr 10. PMID: 22494681.

Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D, Scoggin KE, Squires EL, Troedsson MH. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction*. 2013 Mar 1;145(3):289-96. doi: 10.1530/rep-12-0452. PMID: 23580950.

Zanetti M, Gortan Cappellari G, Burekovic I, Barazzoni R, Stebel M, Guarnieri G. Caloric restriction improves endothelial dysfunction during vascular aging: Effects on nitric oxide synthase isoforms and oxidative stress in rat aorta. *Exp Gerontol*. 2010 Nov;45(11):848-55. doi: 10.1016/j.exger.2010.07.002. Epub 2010 Jul 14. PMID: 20637278.

Carluccio A, Veronesi MC, Plentida D, Mazzatenta A. Uterine infusion of platelet-rich plasma and pregnancy rate in sterile mares with chronic degenerative endometritis. *Set* 2020;23(3):431-438. DOI: 10.24425/pjvs.2020.134688. PMID: 33006855.

Zent, W.W.; Troedsson, M.H.T.; Xue, J.-

L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: A field study. In *In Proc. 40th Am. Assoc. Equine Pract.* 1998, Baltimore, MD, USA, 6 December 1998; Volume 44, pp. 64–65.

Nielsen, J.M. Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 2005, 64, 510–518.

Ferris, R.A.; Bohn, A.; McCue, P.M. Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. *Equine Vet. Educ.* 2015, 27, 316–322.

Cocchia, N.; Paciello, O.; Auletta, L.; Uccello, V.; Silvestro, L.; Mallardo, K.; Paraggio, G.; Pasolini, M.P. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 2012, 77, 89–98.

Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schonberger J, Hoffmann J, Overdevest EP, Box HA, van Zundert A. 2006. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 38(2):174.

Dehghani F, Aboutalebi H, Esmaeilpour T, Panjehshahin MR, Bordbar H. 2018. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on ovarian structures in cyclophosphamide-induced ovarian failure in female rats: a stereological study. *Toxicol Mech Methods*. 28(9):653–659. doi:10.1080/15376516.2018. 1491662.

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

Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W: Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology* 2011, 75:1311–1318

LeBlanc MM, Magsig J, Stromberg AJ. Use of low-volume uterine flush for diagnosis of endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*. August 2007;68(3):403-12. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.038. EPub 2007 May 31st. PMID: 17543379