

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFEITO ANTIMICROBIANO *in vitro* DE TERAPIAS BIOLÓGICAS E NÃO
BIOLÓGICAS EM MICRORGANISMOS CAUSADORES DE ENDOMETRITE
EM ÉGUAS**

MARIANA POLESSO MAZZUCHINI

Botucatu, SP
Fevereiro – 2023

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFEITO ANTIMICROBIANO *in vitro* DE TERAPIAS BIOLÓGICAS E NÃO
BIOLÓGICAS EM MICRORGANISMOS CAUSADORES DE ENDOMETRITE
EM ÉGUAS**

MARIANA POLESSO MAZZUCHINI

Dissertação apresentada junto ao
programa de Biotecnologia Animal
para obtenção do título de
MESTRE.

Orientador: Prof. Dr. Igor Frederico
Canisso

Coorientador: Dr. Lorenzo Garrido
Teixeira Martini Segabinazzi

Botucatu, SP
Fevereiro - 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mazzuchini, Mariana Polesso.

Efeito antimicrobiano in vitro de terapias biológicas e não biológicas em microrganismos causadores de endometrite em éguas / Mariana Polesso Mazzuchini. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Igor Frederico Canisso

Coorientador: Lorenzo Garrido Martini Teixeira
Segabinazzi

Capes: 50504002

1. Equino. 2. Endometrite - Diagnóstico. 3. Biotecnologia animal. 4. Anti-infecciosos.

Palavras-chave: Endometrite infecciosa; Equino; Resistência antimicrobiana; Subfertilidade.

Autora: Mariana Polesso Mazzuchini

Título: EFEITO ANTIMICROBIANO *in vitro* DE TERAPIAS BIOLÓGICAS E NÃO BIOLÓGICAS EM MICRORGANISMOS CAUSADORES DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Igor Frederico Canisso

Presidente da mesa e orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP – Botucatu, SP

Prof. Dra. Fernanda Saules Ignácio

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP – Botucatu, SP

Prof. Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro

Médico Veterinário Autônomo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que sempre me protegeu e me iluminou na minha vida;

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), protocolo 2021/05152-0, que possibilitaram a realização e execução do meu projeto de pesquisa;

Aos meus pais Marta e Roque, e ao meu irmão Rodrigo, que me apoiaram em todas decisões e caminhos percorridos, sempre se esforçando para me proporcionar o melhor e fazer com que eu conseguisse realizar meus sonhos e alcançar meus objetivos;

Ao meu orientador Prof. Dr. Igor e meu coorientador Dr. Lorenzo, que são inspirações e me ensinaram muito sobre determinação e capacidade em alcançarmos aquilo que queremos, não medindo esforços para me ajudarem na minha pesquisa;

À Universidade de Caxias do Sul (UCS), ao Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária e a todos os envolvidos, que cederam o espaço para que realizasse minha pesquisa;

Aos amigos que me apoiaram durante todo este período, tornando esse momento mais leve e feliz.

Obrigada!

RESUMO

A endometrite é a principal causa de subfertilidade em éguas, podendo ser de origem infecciosa ou não infecciosa. O diagnóstico de endometrite se dá pela associação de diferentes técnicas a fim de identificar a presença de neutrófilos e de microrganismos nos casos infecciosos. O tratamento se dá por uma abordagem multimodal, sendo comumente associadas lavagens uterinas, agentes ecbólicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos. Contudo, com o aumento de resistência antimicrobiana, o desenvolvimento de terapias alternativas às tradicionais se faz necessário, uma vez que, a utilização de antimicrobianos na rotina à campo promove o desenvolvimento de microrganismos multirresistentes. Assim, o presente trabalho, no capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica ressaltando a endometrite, classificações, formas de diagnóstico e principais tratamentos, apresentando tratamentos alternativos às terapias tradicionais que possam evitar o desenvolvimento de microrganismos multirresistentes. Já, o capítulo 2 apresenta o artigo no qual foi testada a atividade antimicrobiana de terapias alternativas contra microrganismos causadores de endometrite em éguas. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* de terapias alternativas (NTT) utilizadas na prática clínica contra microrganismos causadores de endometrite em éguas. O experimento foi dividido em terapias não-biológicas, sendo estas: Dimetilsulfóxido (DMSO), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ringer ozonizado (O_3 , 60µg/ml de ozônio durante 10 minutos), Iodopovidona 4% (Iodine), e terapias biológicas: plasma rico em plaquetas (PRP, $1056 \pm 198 \times 10^3$ plaquetas/µl) e plasma pobre em plaquetas (PPP, $37 \pm 14 \times 10^3$ plaquetas/µl). Os microrganismos testados foram *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudo*), *Klebsiella pneumoniae* (*Kleb*), *Staphylococcus aureus* (*Staph*), e *Candida albicans* (*Candida*). Dentre as terapias alternativas não-biológicas, a H_2O_2 apresentou os melhores efeitos inibitórios *in vitro*. Já, das terapias alternativas biológicas, o PRP foi mais eficiente quando comparado ao PPP. Assim, a H_2O_2 e o PRP apresentaram-se eficientes na inibição de microrganismos causadores de endometrite em éguas, contudo, estudos *in vivo* são necessários para avaliar o efeito clínico das terapias.

Palavras-chave: endometrite infecciosa, equinos, resistência antimicrobiana, subfertilidade

ABSTRACT

Endometritis is considered the leading cause of subfertility in mares, being infectious or non-infectious. The diagnosis of endometritis is done using different techniques to identify the presence of neutrophils and microorganisms on infectious cases. Treatment is based on a multimodal approach that commonly associates uterine lavage, ecboic agents, anti-inflammatories and antibiotics. However, within high levels of antimicrobial resistance, new non-traditional therapies are necessary, once, indiscriminate use of antimicrobials in the field promotes multidrug-resistant microorganisms' development. Thus, at the Chapter 1, it was performed a literature review, emphasizing the endometritis, classifications, diagnosis, treatments and alternative therapies that have been used to avoid antimicrobial resistance development. Besides that, on Chapter 2, there is an article where it was assessed the antimicrobial activity of alternative therapies against microorganisms that causes endometritis in mares. This study aimed to assess the *in vitro* antimicrobial effect of alternative therapies (NTT) that are commonly used to treat infectious endometritis. The experiment was subdivided in non-biological therapies as: Dimethylsulfoxide (DMSO), Hydrogen Peroxide (H₂O₂), ozonated ringer (O₃, 60µg/ml of ozone for 10 minutes), Povidone-iodine 4% (Iodine); and biological therpaies: platelet-rich (PRP, 1056±198 x10³platelets/µl) and platelet-poor plasma (PPP, 37±14 x10³platelets/µl). The microorganisms that were tested were: *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudo*), *Klebsiella pneumoniae* (*Kleb*), *Staphylococcus aureus* (*Staph*), and *Candida albicans* (*Candida*). Of non-biological alternative therapies, H₂O₂ presented the best *in vitro* inhibitory effects, and of biological alternative therapies, PRP was more effective when compared with PPP. Thus, H₂O₂ and PRP presented good *in vitro* effects to inhibit microorganisms causing endometritis in mares, however, *in vivo* studies are necessary to evaluate the clinical effect of each therapy.

Key-words: antimicrobial resistance, equine, infectious endometritis, subfertility

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	2
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 ENDOMETRITE	4
2.1.1 Endometrite infecciosa	4
2.1.2 Endometrite não-infecciosa.....	5
2.1.3 Endometrite crônica	6
2.2 DIAGNÓSTICO	6
2.3 TRATAMENTO	9
2.3.1 Lavagens uterinas	9
2.3.2 Anti-inflamatórios.....	10
2.3.3 Agentes ecbólicos.....	10
2.3.4 Antimicrobianos.....	11
2.3.4.1 Iodo-povidona	13
2.3.4.2 Peróxido de hidrogênio	13
2.3.4.3 Dimetilsulfóxido	13
2.3.4.4 N-acetilcisteína	14
2.3.4.5 Tris-EDTA	14
2.3.4.7 Células tronco mesenquimais	15
2.3.4.8 Plasma rico em plaquetas.....	16
2.3.4.10 Coca-cola®	19
3 HIPÓTESES.....	20
4 OBJETIVOS.....	20
CAPÍTULO 2	1

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A inflamação uterina é um processo fisiológico que ocorre após a inseminação artificial (IA) ou monta natural, para limpar o excesso de sêmen e microrganismos no lúmen uterino (TROEDSSON; LIU; CRABO, 1998). Entretanto, caso essa inflamação persista em 24 horas após cobertura/IA, esse processo é considerado patológico e essa égua denominada como susceptível à endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) (TROEDSSON et al., 2001a). A EPPC é a maior causa de subfertilidade em éguas, e é a terceira doença mais frequente em equinos (TRAUB-DARGATZ; SALMAN; VOSS, 1991). Estima-se que aproximadamente 15-25% das éguas em programas reprodutivos são consideradas susceptíveis à endometrite. Acredita-se ainda que esse número é ainda maior em éguas doadoras de embriões, particularmente aquelas que se mantêm por vários anos em programas de transferência de embriões (TE) (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020b).

A endometrite infecciosa é principalmente causada por bactérias, contudo, alguns fungos também estão relacionados ao estabelecimento de patologia (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016a; TROEDSSON, 1999). Dentre os principais agentes patogênicos encontram-se *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020c; CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016c)

A conduta terapêutica em éguas com endometrite varia conforme a etiologia e comumente engloba a associação entre lavados uterinos para remoção do fluido inflamatório, e a aplicação local de agentes antimicrobianos nos casos de endometrites infecciosas. Além disso, agentes ecbólicos e anti-inflamatórios são comumente empregados (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020). Entretanto, com o constante aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, busca-se cada vez mais pelo emprego de terapias alternativas que possam racionalizar, bem como substituir o uso de antibióticos.

As lavagens uterinas são parte da abordagem terapêutica que vêm sendo abordadas para tratar endometrite. Sendo capazes de remover os debris inflamatórios e minimizar a carga de microrganismos, podendo ser associadas a outros agentes sanitizantes tais como iodopovidona (Iodine), peróxido de hidrogênio (H₂O₂),

dimetilsulfóxido (DMSO) e ácido acético, conforme a etiologia da endometrite (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020b; FERRIS et al., 2016; SCOGGIN, 2016b).

O uso indiscriminado de antibióticos em animais tem se mostrado como um dos responsáveis pelo aumento da resistência antimicrobiana, e infelizmente o desenvolvimento da transmissão de bactérias portadoras de resistência aos antibióticos comumente utilizados na rotina clínica. Assim, diversas terapias não tradicionais vêm sendo empregadas na rotina clínica a fim de minimizar os mecanismos de resistência. Contudo, os estudos comprovando a eficácia biológica destas substâncias contra os microrganismos causadores de endometrite ainda é limitado, fazendo-se necessária a investigação do real efeito contra os patógenos.

O presente capítulo tem como objetivo apresentar os principais aspectos da endometrite, ressaltando a endometrite infecciosa e o desenvolvimento das terapias não convencionais que podem ser utilizadas para minimizar o estabelecimento de resistência contra agentes antimicrobianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENDOMETRITE

A endometrite é a principal causa de subfertilidade em éguas, podendo ser de origem infecciosa ou não infecciosa. A endometrite não-infecciosa é principalmente atribuída à deposição de sêmen no trato reprodutivo (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016a). Já, a endometrite infecciosa é principalmente causada por bactérias e por fungos (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020b; CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016c). Comumente na prática clínica observa-se a associação de ambas as formas de endometrite (FERRIS, 2016a; KITAYA et al., 2018).

O estabelecimento da endometrite varia conforme a suscetibilidade ou resistência das fêmeas ao processo inflamatório, sendo estas, classificadas em éguas resistentes ou susceptíveis (PYCOCK et al., 1997). Tal suscetibilidade é estabelecida de forma prática pela observação de >2mm de fluído intrauterino na imagem ultrassonográfica de fêmeas em estro, sendo as falhas na limpeza uterina consequências de ambas as formas de endometrite (BRINSKO et al., 2003; WOODWARD; TROEDSSON, 2014).

Éguas apresentando defeitos anatômicos (conformação vulvar pobre, esfíncter vestibulo-vaginal rompido, útero penduloso, contratilidade uterina prejudicada e incompetência cervical) são mais propensas a aspirar ar ou acumular líquido na vagina e útero, o que torna a égua simultaneamente propensa à entrada de patógenos e estabelecimento de inflamações endometriais (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020b; TROTTER; MCKINNON, 1988). Assim, éguas que apresentem uma resposta imunológica competente e anatomia funcional do trato reprodutivo são capazes de eliminar infecções espontaneamente em 24 a 48 horas (éguas resistentes à endometrite), enquanto éguas com resposta imunológica deficiente são incapazes de combater o estabelecimento da endometrite (éguas susceptíveis) (CHRISTOFFERSEN et al., 2012a; FUMUSO et al., 2003).

2.1.1 Endometrite infecciosa

A inflamação endometrial infecciosa se dá em consequência à entrada de patógenos no trato reprodutivo da égua. Tal condição pode se apresentar de forma aguda,

crônica, clínica ou subclínica, abrangendo diferentes quadros de subfertilidade em fêmeas equinas. Tendo grande impacto na indústria reprodutiva, a endometrite infecciosa é causada principalmente por bactérias, mas cerca de 10% tem etiologia fúngica. Além disso, infecções mistas, contemplando a presença de mais que um microrganismo, podem ser observadas. (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020a; RASMUSSEN et al., 2015; RAVAIOLI et al., 2022).

A entrada dos microrganismos se dá principalmente através do contato do sêmen com o útero, seja ele através de IA ou ainda, monta natural. Além disso, animais que apresentem defeitos anatômicos, sejam eles cervicais, uterinos ou ainda, vulvares, podem apresentar uma predisposição à entrada de ar no trato reprodutivo, facilitando a inserção de microrganismos oportunistas. Tais patógenos geram desafios no ambiente uterino de éguas susceptíveis à endometrite, as quais apresentam dificuldades para contornar a condição infecciosa e acabam apresentando uma redução nas taxas de fertilidade em decorrência da instituição de um ambiente hostil, incompatível com a sobrevivência de um embrião (CARNEVALE et al., 2000; RASMUSSEN et al., 2015; TROEDSSON et al., 2001).

2.1.2 Endometrite não-infecciosa

A endometrite não infecciosa é causada principalmente pela deposição de sêmen no trato reprodutor das éguas. Tal condição é conhecida como endometrite pós-cobertura e é considerada um mecanismo de defesa fisiológico quando observada por até 24 horas após a cobertura, tendo como objetivo promover a limpeza do ambiente uterino (KATILA; FERREIRA-DIAS, 2022). Contudo, tal processo pode ocorrer de forma prolongada em éguas incapazes de realizar a remoção dos neutrófilos do ambiente uterino, sendo conhecido como endometrite persistente/prolongada pós-cobertura, a qual, se não tratada de forma apropriada pode se tornar um processo infeccioso (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016; KATILA; FERREIRA-DIAS, 2022).

O sistema imune das fêmeas é formado pela resposta inata e adaptativa. A resposta adaptativa é específica e adquirida com o contato sucessivo à um agente (SAKAGUCHI, 2000). Já a resposta inata é inespecífica, e produz resposta rápida contra antígenos (FEDORKA, 2017). Éguas susceptíveis à endometrite apresentam alterações na capacidade de controlar tal mecanismo, apresentando um processo inflamatório prolongado (KATILA; FERREIRA-DIAS, 2022). Nestes casos, o contato prolongado do

conteúdo inflamatório com o lúmen uterino faz com que ocorram alterações na mucosa uterina, modificando a capacidade de limpeza pelas células mucociliares e consequentemente possibilitando a aderência de microrganismos (MORRELL; ROCHA, 2022).

O início da cascata inflamatória se dá pelo reconhecimento de antígenos, assim, estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias levando à uma vasodilatação, migração de neutrófilos e destruição do tecido local. Contudo, ao mesmo tempo, citocinas anti-inflamatórias reduzem a ação das pró-inflamatórias na tentativa de minimizar os danos teciduais e contornar a inflamação (TROEDSSON et al., 2001). Éguas susceptíveis à endometrite apresentam uma alteração na secreção de citocinas anti-inflamatórias, postergando a reversão do quadro e consequentemente prolongando o processo inflamatório (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020b; CHRISTOFFERSEN; TROEDSSON, 2017; TROEDSSON; WOODWARD, 2016).

2.1.3 Endometrite crônica

A endometrite crônica é um processo multifatorial, o qual está relacionado à problemas na conformação cervical, vulvar e idade (MORRELL; ROCHA, 2022). Além disso, o estabelecimento da endometrite crônica se dá em consequência das falhas na realização de um tratamento correto nos casos agudos (BUCZKOWSKA et al., 2015a). Éguas idosas múltiparas foram descritas por apresentarem alterações endometriais como degeneração vascular e alterações de contratilidade, tais alterações são relacionadas à subfertilidade e infertilidade nestes animais (ESTELLER-VICO; LIU; COUTO, 2012). Assim, éguas que apresentam um processo inflamatório crônico, em consequência, mostram destruição da conformação glandular pela deposição de fibroblastos e degeneração endometrial (HOFFMANN et al., 2009).

2.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de endometrite se dá pela associação do histórico, exame clínico e a coleta de amostras uterinas (FERRIS, 2016a). Éguas com relatos recorrentes de fluído intrauterino, presença de descargas vaginais, perdas embrionárias, dificuldade em engravidar são geralmente consideradas susceptíveis à endometrite (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020). A avaliação do trato reprodutivo é essencial para identificar qualquer alteração, sendo observada a conformação perineal, presença de

secreções e alterações anatômicas (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020; WOODWARD et al., 2014).

A coleta de material uterino é a principal forma para o estabelecimento do diagnóstico de endometrite, diferenciando-se em infecciosa e não infecciosa. Existem diferentes técnicas para obtenção das amostras, desde pela utilização de swab, escova citológica, realização de biópsias ou lavado de baixo volume (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020). A realização de lavados de baixo volume, em comparação à coletas utilizando swab ou escova citológica, aumenta a acurácia dos resultados obtidos, uma vez que, as demais técnicas possibilitam a coleta de material oriundo apenas de uma porção específica do corpo uterino, enquanto o lavado perfunde em toda superfície endometrial, recuperando-se amostras de todas as porções do útero (FERRIS, 2016).

A citologia endometrial realizada com swab, escova citológica, ou lavado de baixo volume, possibilita a avaliação da composição celular endometrial, enquanto a cultura microbiológica possibilita a identificação de agentes patológicos. A associação de ambas técnicas diagnósticas é considerada recomendada para o diagnóstico da endometrite, uma vez que, quando utilizadas de formas separadas, ambas apresentam diversos resultados falso-negativos (OVERBECK; WITTE; HEUWIESER, 2011).

A interpretação dos resultados da citologia consiste na contabilização de neutrófilos (PMN) presentes na lâmina, considerando-se $>2\%$ de PMN presença de endometrite (OVERBECK; WITTE; HEUWIESER, 2011). Já, na realização de cultura microbiológica, na rotina a campo, a identificação dos microrganismos pode ser realizada através da realização de análise morfológica e coloração de Gram, e ainda, utilização de ágar cromogênico (DIVINE; MCCUE, 2021; FERRIS, 2016). Contudo, existem relatos de animais subférteis que apresentam o patógeno de forma “dormente” no ambiente uterino, prejudicando o estabelecimento de um diagnóstico adequado e dificultando o tratamento correto (NOCERA et al., 2021; PETERSEN et al., 2015). Assim, nos casos em que não seja identificado nenhum microrganismo nas amostras coletadas, e a suspeita de endometrite infecciosa persista, pode-se realizar a “ativação” de tais patógenos, facilitando sua identificação através da utilização de bActivate[®], um produto comercial, descrito por ser um meio de crescimento bacteriano capaz de ativar microrganismos fastidiosos como o *Streptococcus zooepidemicus* (PETERSEN et al., 2015).

A biópsia e análise histopatológica é considerada como o padrão ouro de diagnóstico de endometrite, possibilitando avaliar tanto as características celulares

endometriais, presença de microrganismos, observação de muco característico como biofilme, deposição de fibrose e características e distribuição glandular. Além disso, a cultura microbiológica, quando realizada utilizando a biópsia tecidual, aumenta a acurácia dos resultados, facilitando a identificação de infecções profundas e dormentes (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020; MØLLER NIELSEN et al., 2012).

Após a identificação dos microrganismos é essencial realizar-se o teste de sensibilidade antimicrobiana evitando-se assim a resistência antimicrobiana (BIEMER, 1973). Todas as técnicas de diagnóstico e escolha de antimicrobianos, para que sejam validadas, devem ser baseadas no “Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI” (NCCLS, 2019).

Existem diferentes técnicas para avaliação da susceptibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, dentre as principais técnicas utilizadas encontram-se a técnica de disco-difusão, também conhecida como Kirby-Bauer (BIEMER, 1973). Tal técnica consiste na inoculação do microrganismo numa placa de Petri, e após, a adição de discos contendo os agentes antimicrobianos a serem testados. A interpretação consiste na mensuração do halo formado por cada antimicrobiano, classificando o microrganismo em susceptível, intermediário e resistente (QUINN et al., 2007).

Os efeitos dos antimicrobianos também pode ser avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), tendo como objetivo estabelecer a maior diluição capaz de inibir e causar morte celular dos patógenos. Tal avaliação é realizada através de técnicas de diluição em caldo, podendo ser utilizadas tanto macrodiluições quanto microdiluições (NCCLS, 2019). A determinação da CIM é realizada comumente pela determinação da turbidez do caldo, podendo ser realizada tanto de forma visual quanto através da mensuração de densidade óptica. Além disso, testes de viabilidade com a utilização de corantes como a resazurina sódica auxiliam na observação da atividade celular (LISBOA et al., 2022). A resazurina é um corante azul que, na presença de atividade celular, é oxidado e transformado em resorufina, de coloração rosa, sendo capaz de identificar a atividade dos microrganismos (MANN; MARKHAM, 1998). A CMB é determinada após a realização da CIM, reinoculando-se os caldos capazes de gerar um valor de CIM, e de concentrações superiores e quantificando-se o número de colônias (NCCLS, 2019; QUINN et al., 2007).

2.3 TRATAMENTO

O tratamento de endometrite se dá através de uma abordagem multimodal, unindo-se diferentes técnicas a fim de reverter o processo inflamatório nos diferentes casos. A associação de lavados uterinos, agentes ecbólicos, anti-inflamatórios, mucolíticos, imunomoduladores e antimicrobianos pode ser realizada. Além disso, a correção de alterações anatômicas que predispõe tal processo inflamatório deve estar associado (MORRELL; ROCHA, 2022). Ressaltando-se a importância da avaliação individual para estabelecimento do tratamento correto. O tratamento de endometrite deve ser realizado durante o estro, quando a cérvix se encontra aberta, possibilitando a drenagem do conteúdo administrado, e ainda, aumentando a resposta inflamatória celular (SCOGGIN, 2016).

Com o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, busca-se cada vez mais a inclusão de terapias alternativas que possam substituir os fármacos convencionais. Entretanto, ressalta-se a importância do estabelecimento correto dos produtos, evitando efeitos indesejados na mucosa dos animais, ou ainda, agravamento do quadro clínico.

2.3.1 Lavagens uterinas

As lavagens uterinas são conhecidas como importantes adjuvantes no tratamento da endometrite, sendo consideradas a melhor forma de limpeza mecânica do útero (LU; VON DOLLEN, 2021). Através delas, é possível a remoção de exsudato, minimizando a população de microrganismos e fluídos inflamatórios, melhorando assim o ambiente uterino (BRINSKO et al., 1989; BRINKSO, 2001; SCOGGIN, 2016). Dentre as principais soluções utilizadas para a realização das lavagens uterinas encontram-se as soluções cristalóides como a Solução de Ringer Lactato (LRS) e a Solução de Cloreto de Sódio 0,9% (NaCl 0,9%) (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020).

A remoção de debris celulares presentes no lúmen uterino potencializa a absorção fármacos antimicrobianos, uma vez que, aumenta a superfície de absorção das drogas, e consequentemente, minimiza o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (FERRIS, 2017). Assim, tais procedimentos são recomendados como aliados no tratamento da endometrite, podendo-se ainda realizar-se associações com agentes sanitizantes como iodopovidona e peróxido de hidrogênio (CANISSO, SEGABINAZZI, FEDORKA, 2020; SCOGGIN, 2016). Nos casos de éguas susceptíveis à endometrite, as

lavagens uterinas utilizando LRS ou NaCL 0,9% podem ser realizadas 4 a 6 horas após a IA ou cobertura, removendo o excesso de espermatozoides, fluído inflamatório e microrganismos presentes no sêmen e assim prevenindo o prolongamento do processo inflamatório (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020b; LU; VON DOLLEN, 2021).

2.3.2 Anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios, sejam esteroidais ou não-esteroidais podem ser utilizados para auxiliar no tratamento da endometrite a fim de reduzir a resposta inflamatória. Glicocorticoides parecem modular a resposta imune inata em éguas susceptíveis à endometrite, e aumentar os índices de fertilidade (CHRISTOFFERSEN et al., 2012b). Contudo, sua utilização em equinos deve ser realizada com cautela, uma vez que, sugere-se que em animais que apresentem fatores de predisponentes associados, a utilização de glicocorticoides pode promover o desenvolvimento de laminite (POTTER; STEVENS; MENZIES-GOW, 2019).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais, por outro lado, também podem ser utilizados para o tratamento de endometrite, contudo, sabe-se que a utilização de flunixin-meglumine, inibidor de COX-1, pré-ovulação pode causar falhas ovulatórias e gerar folículos luteinizados que não rompem (POTTER; STEVENS; MENZIES-GOW, 2019). Já, a utilização de firocoxib, um anti-inflamatório não-esteroidal inibidor de COX-2, é capaz de modular a resposta inflamatória após a cobertura, sem que ocorram o desenvolvimento de falhas ovulatórias ou diminuição da recuperação embrionária (FRISO et al., 2019).

2.3.3 Agentes ecbólicos

As ocitocinas e as prostaglandinas são os principais fármacos com ação ecbólica utilizados em éguas, sendo capazes de auxiliar na eliminação do acúmulo de fluído uterino através da cérvix e drenagem linfática (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016). Tais fármacos são importantes aliados no tratamento multimodal da endometrite, uma vez que, éguas susceptíveis apresentam falhas na limpeza uterina em decorrência do excesso de óxido nítrico, radical livre de ação miorelaxante que retardam a contratilidade uterina (WOLF et al., 2016). A ocitocina é capaz de promover uma resposta contrátil de até 45 minutos, enquanto as prostaglandinas apresentam uma

resposta contrátil de até duas horas (TROEDSSON et al., 1995). Em éguas com útero penduloso, a promoção de uma resposta contrátil mais longa parece ser melhor quando comparada a um tempo curto (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016). Contudo, a aplicação de prostaglandinas periovulatória pode ocasionar a luteólise parcial do corpo lúteo e diminuição das taxas gestacionais (TROEDSSON et al., 2001c).

2.3.4 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias essenciais para manutenção da saúde dos seres vivos, sendo primordiais no tratamento de doenças infecciosas, reduzindo os níveis de mortalidade e morbidade (AMINOV, 2017). Os antibióticos são considerados substâncias naturais produzidas por microrganismos, ou por outra origem biológica que em baixas concentrações são capazes de inibir o crescimento ou matar microrganismos (ETEBU; ARIKEKPAR, 2016).

A escolha do fármaco a ser utilizado no trato reprodutor das éguas deve ser baseada principalmente nos testes de susceptibilidade coletados de cada indivíduo (FERRIS, 2017). Podendo ser associados a lavagens uterinas, a fim de melhorar o contato dos antimicrobianos com a mucosa uterina, muitas vezes prejudicada pela presença de exsudato purulento produzido durante o processo de endometrite infecciosa (FERRIS, 2017; LEBLANC; CAUSEY, 2009).

A utilização de agentes antimicrobianos para o tratamento de endometrite em éguas pode ser realizada tanto de forma intrauterina, quanto de forma sistêmica (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020). A administração intrauterina minimiza o efeito dos agentes farmacológicos alterando a flora de outros sistemas, além de aumentar a concentração farmacológica no endométrio, diminuindo a dose administrada, quando comparada à administração sistêmica (LEBLANC, 2009). Os antimicrobianos quando administrados de forma sistêmica, por tempo prolongado, podem gerar efeitos indesejados nos equinos como colite e diarreia (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020). Já a administração local pode gerar irritações, absorção tecidual ineficiente e ainda, ocasionar resistência antimicrobiana (HARDEFELDT; BAILEY; SLATER, 2021).

Os antibacterianos são a classe farmacológica mais utilizada na medicina veterinária, sendo divididos em diferentes grupos como: betalactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, glicopeptídeos, tetraciclina, macrolídeos, entre outros

(ETEBU; ARIKEKPAR, 2016). A utilização correta de antimicrobianos envolve diferentes fatores como: a necessidade real da administração destes fármacos para o tratamento das patologias; utilização dos fármacos corretos para cada microrganismo, minimizando os tratamentos empíricos; o estabelecimento de uma dose necessária para atingir as concentrações terapêuticas em cada região; momento de administração dos fármacos para cada situação; via de administração para que se obtenham os melhores resultados, e, duração do tratamento a ser estabelecido em cada paciente (HARDEFELDT; BAILEY; SLATER, 2021).

Mesmo quando aplicado pela via intrauterina, ainda existem casos que, aplicação sistêmica se torna necessária. Dentre os principais fármacos utilizados encontram-se: amicacina, penicilina, ceftiofur, gentamicina e ampicilina (LEBLANC, 2009). Contudo, em casos em casos onde observa-se a formação de biofilme, a utilização estrita de antibióticos muitas vezes não é suficiente, fazendo-se necessária a associação de tratamentos quelantes de biofilme (TROEDSSON; NIELSEN, 2018). Já, o tratamento de endometrite fúngica não está totalmente elucidado, contudo, é composto por diferentes abordagens as quais iniciam pela correção dos defeitos anatômicos que predispõe ao estabelecimento da endometrite (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020). Além disso, lavagens uterinas e a administração sistêmica e intrauterina de agentes antifúngicos podem ser realizadas para contornar o quadro infeccioso (SCOTT, 2020).

As falhas às respostas a terapias antimicrobianas estão principalmente relacionadas à cronicidade das infecções, às populações mistas dos microrganismos e a características relacionadas a distribuição da infecção no ambiente uterino (MORRELL; ROCHA, 2022). Diversos estudos realizados analisando a susceptibilidade de agentes causadores de endometrite, em éguas e jumentas demonstraram resistência à antimicrobianos comumente utilizados na rotina clínica (BENKO et al., 2015; DÍAZ-BERTRANA et al., 2021; ZHAO et al., 2022). Tal resistência é agravada em microrganismos capazes de formar biofilme, uma vez que, apenas os microrganismos localizados externamente à matriz polimérica entram em contato com os fármacos (MORRELL; ROCHA, 2022). Assim, busca-se cada vez mais a inclusão de terapias alternativas que possam substituir os fármacos convencionais. Estas terapias podem servir como auxiliares no tratamento de doenças infecciosas e ainda, em alguns casos, possibilitam a redução do biofilme produzido por alguns microrganismos (REX et al., 2019).

2.3.4.1 Iodo-povidona

A iodo-povidona é utilizada como agente antisséptico há mais de 150 anos na medicina humana. Conhecido pelo seu alto potencial oxidativo, sabe-se que é capaz de reagir com aminoácidos e ácidos graxos insaturados promovendo a destruição celular e enzimática (FLEISCHER; REIMER, 1997). Por sua capacidade antisséptica, lavagens utilizando iodo-povidona 1% foram descritas por serem a melhor forma de prevenção de endometrite pós-parto em mulheres (ROECKNER et al., 2019). Além disso, em éguas, sua utilização é recomendada para o tratamento de endometrite fúngica e bacteriana (FERRIS, 2017; LU; VON DOLLEN, 2021).

2.3.4.2 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é capaz de inibir processos enzimáticos através das suas propriedades oxidativas, sendo as infusões uterinas utilizando-se soluções de 3% recomendadas nos casos de endometrite infecciosa (MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020; FERRIS, 2017; MCCUE; FERRIS, 2016). Entretanto, em bactérias que utilizam a enzima catalase para quebrar a molécula de peróxido de hidrogênio e assim reduzir sua citotoxicidade, a solução não é capaz de apresentar efeito antibacteriano em baixas concentrações (SERRA-MAIA et al., 2018).

2.3.4.3 Dimetilsulfóxido

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto utilizado como solvente em laboratórios e na indústria. Entretanto, foi descoberto na medicina por suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, mucolíticas e redutoras de biofilme (MCCUE; FERRIS, 2016). Em soluções de 2,5 a 30%, o DMSO foi capaz de inibir o crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli*, sendo estas as principais causas de endometrite em fêmeas equinas (MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020). Para o tratamento de endometrite infecciosa, recomenda-se a utilização de DMSO 5-20% para realização de lavados uterinos, ressaltando-se sua capacidade de agir contra a formação de biofilme e seu potencial antimicrobiano (FERRIS et al., 2016; LONCAR et al., 2017; MCCUE; FERRIS, 2016).

O mecanismo de ação do dimetilsulfóxido é atribuído à sua capacidade em remover radicais livres, reduzir a inflamação endometrial e consequentemente, reduzir a

perfusão de células inflamatórias no ambiente uterino. Contudo, altas concentrações de DMSO podem causar ulcerações teciduais, devendo-se utilizá-lo com cautela (CANISSO; COUTINHO DA SILVA, 2007).

2.3.4.4 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína é um agente mucolítico com propriedades antioxidantes, capaz de atuar frente a processos inflamatórios crônicos contendo propriedades antimicrobianas (KATILA, 2016; PYÖRÄLÄ; TAPONEN; KATILA, 2014). Quando aplicada de forma intrauterina em soluções 3,3% atua como agente bactericida frente à cepas de *E.coli*, sendo uma alternativa à ser associada ao tratamento de endometrite bacteriana, ressaltando ainda, sua atividade anti-inflamatória e imunomodulatória (FERRIS, 2017). A administração oral de N-acetilcisteína é incapaz de gerar as concentrações necessárias uterinas para promoção dos efeitos anti-inflamatórios, mucolíticos e antibacterianos, sendo assim, a administração do fármaco intrauterino a mais recomendada nos casos de alterações reprodutivas (KATILA, 2016)

2.3.4.5 Tris-EDTA

O tris-EDTA é considerado um quelante de metais pesados utilizado para potencialização da absorção de agentes antimicrobianos na mucosa uterina. Isso ocorre pela sua capacidade de quebrar o biofilme produzido por algumas bactérias (KATILA, 2016; MCCUE; FERRIS, 2016). O potencial antimicrobiano se dá pela sua capacidade em alterar a composição da membrana de lipopolissacarídeos presente nas bactérias gram-negativas, aumentando a permeabilidade dos fármacos (FINNEGAN; PERCIVAL, 2015). A associação de tris-EDTA a antimicrobianos como oxitetraciclina, penicilina, ampicilina, miconazol e itraconazol é sinérgica, sendo uma boa opção nos casos de endometrite crônica, em que se espera uma resistência maior dos agentes patogênicos à absorção dos fármacos utilizados devido a presença de biofilme (LEBLANC, 2009).

A utilização de infusões uterinas de tris-EDTA no endométrio de éguas é um procedimento considerado seguro, sendo incapaz de gerar alterações estruturais no endométrio, ou ainda, aumentar os processos inflamatórios (YOUNGQUIST et al., 1984). Assim, é considerado um grande aliado no tratamento de endometrite infecciosa, principalmente em casos de infecções por microrganismos resistentes e formadores de biofilme como a *Pseudomonas aeruginosa* (BUCZKOWSKA et al., 2015a). Contudo,

aparentemente a aplicação única de tris-EDTA por 6 horas é incapaz de quebrar o biofilme pré-formado, mas é capaz de gerar morte celular em bactérias planctônicas (FERRIS et al., 2016). Assim, possivelmente para que ocorra a quebra do biofilme pré-formado seja necessário um maior tempo de exposição ao fármaco.

2.3.4.6 Ozonioterapia

O ozônio é uma molécula tripla de oxigênio, altamente reativa e capaz de realizar oxidação celular. Misturas utilizando gás ozônio com oxigênio vem sendo disseminadas como promessa com diferentes aplicações na rotina clínica. É utilizado na forma de soluções ozonizadas, óleo ozonizado, ou ainda, contato direto do gás através de insuflações e bags. A meia vida da molécula de ozônio varia conforme a temperatura do ambiente, sendo de 40 minutos quando à 20°C e de 140 minutos quando armazenado à 0°C (ELVIS; EKTA, 2011). Quando adicionado ao óleo, o ozônio interage com as ligações duplas de carbono e promove uma reação oxidativa formando peróxidos com ação antimicrobiana, além disso, a aplicação das nanopartículas lipídicas presentes, associada às características hidrofóbicas, impedem a permeabilização de soluções aquosas, prolongando o efeito antimicrobiano (UGAZIO et al., 2020).

Sugerido por suas propriedades analgésicas, imunomoduladoras e antimicrobianas, vem sendo proposto como alternativa para tratar endometrite (ÁVILA et al., 2022; DRAŽEN; LIPAR; SAMARDŽIJA, 2014; REPCIUC; CRECAN; OANA, 2016). As lavagens uterinas utilizando soluções ozonizadas foram descritas como seguras não promovendo alterações no tecido endometrial, ainda que, tenham sido descritas por estimular uma leve inflamação quando comparadas ao grupo controle (MAZZUCHINI et al., 2022). Contudo, em outras condições experimentais, a mistura de gás ozônio/oxigênio, associado às lavagens uterinas utilizando-se solução de ringer lactato, reduziram o processo inflamatório e infeccioso endometrial (ÁVILA et al., 2022).

2.3.4.7 Células tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (MSC) são consideradas um tratamento em potencial para a endometrite em éguas. Capazes de produzir uma resposta imunomoduladora, aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias, além de apresentarem propriedades consideradas antimicrobianas (MORRIS; MCCUE;

AURICH, 2020). Além disso, estimulam a regeneração tecidual, reduzem a infecção associada à inflamação e à fibrose, e através da modulação da resposta imunológica inata, recrutam a ação de neutrófilos e monócitos, facilitando assim a fagocitose de bactérias (JOHNSON et al., 2017).

Em éguas resistentes à endometrite, a aplicação de MSC foi capaz de reduzir a contagem de neutrófilos e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias 6 horas após IA (FERRIS; FRISBIE; MCCUE, 2014). Já, a aplicação de meio condicionado por células tronco em éguas susceptíveis à endometrite, 24 horas antes da IA minimizou o acúmulo de fluido intrauterino pós-cobertura, modulando a resposta inflamatória causada pelo sêmen e reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TONGU et al., 2021). Assim, tanto MSC quanto seus produtos parecem ser eficientes na modulação da resposta inflamatória, tornando-se possíveis aliados no tratamento da endometrite em éguas.

Além do efeito imunomodulador, em um estudo realizado por Herman e colaboradores (2017), observou-se que as MSC são capazes de inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, promovendo alterações de membrana nestas bactérias através de fatores que comprometam sua integridade. Tal atividade antimicrobiana é atribuída principalmente à liberação de peptídeos antimicrobianos pelas MSC (ALCAYAGA-MIRANDA; CUENCA; KHOURY, 2017).

As vesículas extracelulares (EV) produzidas pelas MSC, também parecem ser uma alternativa a ser considerada no tratamento de doenças infecciosas, sendo capazes de promover um efeito imunomodulatório, secretar peptídeos antimicrobianos e ter menor potencial teratogênico (YOU; FU; ZOU, 2021). Em um estudo realizado com ratos, a utilização de EV atenuou infecções respiratórias causadas por *E.coli*. Tal mecanismo foi atribuído principalmente à modulação da resposta dos macrófagos, aumentando a fagocitose dos microrganismos (VARKOUHI et al., 2019).

2.3.4.8 Plasma rico em plaquetas

Nos últimos 20 anos, o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo ganhou grande popularidade em diferentes campos da medicina humana e veterinária. O PRP consiste em plasma total, contendo uma grande quantidade plaquetária e diversos fatores de crescimento que podem atuar nos tecidos lesionados através de efeitos mitogênicos, neovasculares e anti-inflamatórios (EL-SHARKAWY et al., 2007; JANG; KIM; CHA, 2013; MAZZOCCA et al., 2013). As plaquetas são pequenos fragmentos celulares

anucleados responsáveis pela hemostasia em processos fisiológicos. Quando ativadas, mudam sua conformação, expondo pseudópodes que às permitem se agregar e liberar grânulos contendo fatores de crescimento, estimulando a produção de citocinas e imunidade inata (VANNI, 2016). O PRP, é um modulador de resposta inflamatória cada vez mais utilizado na medicina equina. Ele atua realizando hemóstase no organismo, através da formação de coágulos de fibrina pela ativação e agregação plaquetária e como agente imunomodulador (EPPLEY; WODELL; HIGGINS, 2004). Além disso, o plasma contendo diferentes tipos celulares e citocinas inflamatórias, pode participar na eliminação de agentes infecciosos (HARVEY, 2012).

A produção de plasma rico em plaquetas se dá através de diferentes protocolos de centrifugação sanguínea, sendo sua ação desencadeada por diferentes fatores de crescimento e citocinas, capazes de ser aplicado em diferentes situações na rotina clínica dos equinos (KATILA, 2016). É capaz de diminuir a secreção de interleucinas pró-inflamatórias e óxido nítrico sintase, regulando o desenvolvimento de endometrite em éguas (METCALF; SCOGGIN; TROEDSSON, 2012).

As propriedades regenerativas e de modulação inflamatória do PRP são atribuídas principalmente aos fatores de crescimento nele presentes que apresentam efeito quimiotático com monócitos, neutrófilos, osteoblastos e células tronco mesenquimais, auxiliando na síntese de fibroblastos e musculatura lisa e ainda atuando na regeneração tecidual, deposição de tecido fibroso e angiogênese. Estudos também mostraram que o PRP é capaz de regular a expressão de marcadores inflamatórios endometriais de éguas que apresentavam inflamação uterina exacerbada pós-cobertura (METCALF; SCOGGIN; TROEDSSON, 2012; REGHINI et al., 2015; SEGABINAZZI et al., 2021).

A atividade antimicrobiana do PRP tem sido descrita como alternativa no tratamento de principalmente infecções orais em humanos. O efeito *in vivo* e *in vitro* foi relatado contra bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ÁLVAREZ et al., 2011; ANITUA et al., 2012a; BIELECKI et al., 2007; BURNOUF et al., 2013; CIESLIK-BIELECKA et al., 2009; MOOJEN et al., 2008; TROWBRIDGE et al., 2005; YUAN; ZHANG; ZENG, 2008). As quais, também são consideradas importantes causadoras de endometrite em éguas (CANISSO; STEWART; COUTINHO DA SILVA, 2016). Em um estudo recente, observou-se que a infusão uterina de PRP reduziu o crescimento bacteriano de culturas endometriais coletadas de éguas susceptíveis 3 e 9 dias após a IA (SEGABINAZZI et al., 2021). Além disso, o plasma autólogo foi citado como uma alternativa para o emprego de

agentes antimicrobianos convencionais, além de ser capaz de minimizar e modular a resposta inflamatória endometrial (A MORRIS; MCCUE; AURICH, 2020; SEGABINAZZI et al., 2021).

O PRP inibe o crescimento bacteriano, entretanto, pouco se sabe sobre como ocorre tal controle (MARX, 2004) . A adição de leucócitos ao plasma rico em plaquetas pode aumentar a atividade antimicrobiana do produto, demonstrando-se bactericida contra microrganismos causadores de endometrite em éguas, entretanto, a presença de leucócitos pode promover uma resposta inflamatória em decorrência das proteases pró-inflamatórias por elas secretadas (DRAGO et al., 2013; NEVES et al., 2007).

O gel rico em plaquetas pode ser produzido através da adição de trombina e cloreto de cálcio ao PRP. Tal produto apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* quando utilizado *in vitro*, através do método de disco-difusão em ágar(CIESLIK-BIELECKA et al., 2007). A utilização de plasma rico em fatores de crescimento, ou seja, PRP ativado, demonstrou uma redução bacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, contudo, esta redução ocorreu apenas durante 4 horas de inoculação, sem morte total dos microrganismos durante este período. Assim, após o tempo de efeito da solução, observou-se um novo crescimento bacteriano (ANITUA et al., 2012).

A trombina e o PPP (plasma pobre em plaquetas) não foram correlacionados a qualquer ação antimicrobiana, entretanto, a trombina parece estar relacionada às propriedades antibacterianas do PRP. Isso porque a adição de trombina e consequente ativação plaquetária, aumenta a liberação de substâncias com propriedade antimicrobiana como os grânulos-alfa presentes nas plaquetas (LI; LI, 2013).

2.3.4.9 Querosene

A querosene é um agente irritante que vem sendo utilizado a fim de tratar éguas com histórico de acúmulo de fluído intrauterino crônico. Com capacidade altamente inflamatória, ao entrar em contato com o endométrio, estimula o processo inflamatório inicial, mas, após 21 dias da aplicação, aumenta a atividade glandular e as taxas gestacionais em éguas subferteis (PERKINS, 1999). Além disso, a infusão de querosene é indicada em éguas com infecções crônicas, com suspeita de biofilme, sendo capaz de reduzir o muco e fluído intrauterino através da promoção de necrose epitelial do endométrio. Tal processo estimula a retirada do muco e biofilme, promovendo uma rápida

recuperação endometrial e consequentemente as taxas de prenhez (BUCZKOWSKA et al., 2015).

2.3.4.10 Coca-cola®

A Coca-cola® vem sendo utilizada à campo na justificativa de promover a remoção de conteúdos celulares presentes no útero de éguas consideradas subférteis e ter papel na redução do processo infeccioso. Seu mecanismo de ação é atribuído à hiperosmolaridade e baixo pH do produto, que supostamente são capazes de romper a parede celular bacteriana e diminuir as infecções. A utilização de Coca-cola® já foi descrita na literatura por auxiliar no tratamento de patologias gástricas em crianças, servindo como antiemético e reduzindo a carga microbiana (MUNTEANU, 2020). Contudo, até o presente momento, não existem estudos avaliando o real efeito antimicrobiano do refrigerante de cola contra os microrganismos, ou ainda, para tratar endometrite infecciosa.

3 HIPÓTESES

1- Terapias alternativas como o dimetilsulfóxido, iodopovidona, água oxigenada, ringer ozonizado apresentam efeito antimicrobiano contra microrganismos causadores de endometrite em éguas;

2- O plasma rico em plaquetas pode atuar como agente antimicrobiano, sendo capaz de inibir o crescimento de microrganismos causadores de endometrite em éguas, sendo a concentração plaquetária correlacionada ao efeito antimicrobiano do PRP.

4 OBJETIVOS

1- Avaliar o efeito das terapias alternativas *in vitro* frente a microrganismos isolados de éguas apresentando endometrite infecciosa;

2 - Determinar a concentração mínima de cada terapia capaz de inibir o crescimento bacteriano (MIC) e o percentual de inibição de cada produto contra tais microrganismos.

REFERÊNCIAS

ALCAYAGA-MIRANDA, F.; CUENCA, J.; KHOURY, M. **Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: Current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies.** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 30 mar. 2017.

ÁLVAREZ, M. et al. In vitro bactericidal activity of equine platelet concentrates, platelet poor plasma, and plasma against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archivos de medicina veterinaria*, v. 43, n. 2, p. 155–161, 2011.

AMINOV, R. **History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact.** *Biochemical Pharmacology* Elsevier Inc., , 1 jun. 2017.

ANITUA, E. et al. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 37, n. 6, p. 652–657, ago. 2012a.

ÁVILA, A. C. A. et al. Effectiveness of Ozone Therapy in The Treatment of Endometritis in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 112, 1 maio 2022.

BENKO, T. et al. 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. *Veterinarni Medicina*, v. 60, n. 11, p. 613–620, 2015.

BIELECKI, T. M. et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, v. 89-B, n. 3, p. 417–420, mar. 2007.

BIEMER, J. J. Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Annals of Clinical Laboratory Science*, v. 3, 1973.

BRINSKO, S. ; et al. A Practical Method for Recognizing Mares Susceptible to Post-breeding Endometritis. *AAEP Proceedings*, v. 49, p. 363–365, 2003.

BUCZKOWSKA, J. et al. **Non-traditional treatments for endometritis in mares.** *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* Trakia University, , 2015.

BURNOUF, T. et al. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion*, v. 53, n. 1, p. 138–146, jan. 2013.

CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in mares — A multifaceted challenge: from clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. v. 21, p. 1432, 2020.

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

CARNEVALE, E. M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 54, n. 6, p. 965–979, out. 2000.

- CHRISTOFFERSEN, M. et al. **Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/41>>.
- CHRISTOFFERSEN, M. et al. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 991–1004, 15 set. 2012b.
- CHRISTOFFERSEN, M.; TROEDSSON, M. H. T. **Inflammation and fertility in the mare. Reproduction in Domestic Animals** Blackwell Publishing Ltd, , 1 ago. 2017.
- CIESLIK-BIELECKA, A. et al. **Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity? Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, mar. 2007.
- CIESLIK-BIELECKA, A. et al. Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 41, n. 1, p. 9–12, ago. 2009.
- DÍAZ-BERTRANA, M. L. et al. Microbial prevalence and antimicrobial sensitivity in equine endometritis in field conditions. **Animals**, v. 11, n. 5, 1 maio 2021.
- DIVINE, C.; MCCUE, P. **How to Identify Common Bacterial Pathogens from an Equine Uterine Sample in Clinical Practice.** [s.l: s.n.].
- DRAGO, L. et al. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. **BMC microbiology**, v. 13, 2013.
- DRAŽEN, Đ.; LIPAR, M.; SAMARDŽIJA, M. Ozone treatment of metritis and endometritis in Holstein cows. **Veterinarski Arhiv**, v. 84, n. 2, p. 103–110, 2014.
- EL-SHARKAWY, H. et al. Platelet-Rich Plasma: Growth Factors and Pro- and Anti-Inflammatory Properties. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 4, p. 661–669, abr. 2007.
- ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. **Ozone therapy: A clinical review. Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, jan. 2011.
- EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 114, n. 6, p. 1502–1508, nov. 2004.
- ESTELLER-VICO, A.; LIU, I. K.; COUTO, S. Uterine vascular degeneration is present throughout the uterine wall of multiparous mares. Colinearity between elastosis, endometrial grade, age and parity. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 1078–1084, 15 set. 2012.
- ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **IJAMBR**, v. 4, p. 90–101, 2016.
- FEDORKA, C. An Investigation into Specific Seminal Plasma Proteins and Their Effect on the Innate Immune Response to Breeding in the Mare. **UKnowledge**, 2017.

- FERRIS, R. A. et al. In Vitro Efficacy of Nonantibiotic Treatments on Biofilm Disruption of Gram-Negative Pathogens and an in Vivo Model of Infectious Endometritis Utilizing Isolates from the Equine Uterus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 631–639, 1 mar. 2016.
- FERRIS, R. A. **Endometritis: Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. Veterinary Clinics of North America - Equine Practice** W.B. Saunders, , 1 dez. 2016a.
- FERRIS, R. A. **Endometritis: Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. Veterinary Clinics of North America - Equine Practice** W.B. Saunders, , 1 dez. 2016b.
- FERRIS, R. A. Therapeutics for Infectious Endometritis: A Clinical Perspective. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 41, n. 1, p. 175–179, 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, 1 jul. 2014.
- FINNEGAN, S.; PERCIVAL, S. L. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 7, p. 415–421, jul. 2015.
- FLEISCHER, W.; REIMER, K. Povidone-Iodine in Antisepsis - State of the Art. **Dermatology**, v. 195, n. 2, p. 3–9, 1997.
- FRISO, A. M. et al. Periovarian administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. **Theriogenology**, v. 138, p. 24–30, 15 out. 2019.
- FUMUSO, E. et al. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1–2, p. 31–41, 15 nov. 2003.
- HARDEFELDT, L. Y.; BAILEY, K. E.; SLATER, J. **Overview of the use of antimicrobial drugs for the treatment of bacterial infections in horses. Equine Veterinary Education** Equine Veterinary Journal Ltd, , 1 nov. 2021.
- HARVEY, J. W. **Veterinary hematology : a diagnostic guide and color atlas**. [s.l.: s.n.].
- HOFFMANN, C. et al. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2–4, p. 261–278, abr. 2009.
- JANG, S. J.; KIM, J. DO; CHA, S. S. Platelet-rich plasma (PRP) injections as an effective treatment for early osteoarthritis. **European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology**, v. 23, n. 5, p. 573–580, jul. 2013.
- KATILA, T. Update on endometritis therapy. **Pferdeheilkunde**, v. 32, n. 1, p. 39–45, 1 jan. 2016.

KATILA, T.; FERREIRA-DIAS, G. **Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares.** *AnimalsMDPI*, , 1 mar. 2022a.

KATILA, T.; FERREIRA-DIAS, G. **Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares.** *AnimalsMDPI*, , 1 mar. 2022b.

KITAYA, K. et al. **Endometritis: new time, new concepts.** *Fertility and Sterility* Elsevier Inc., , 1 ago. 2018.

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

LEBLANC, M. M. The current status of antibiotic use in equine reproduction. **Equine Veterinary Education**, v. 21, n. 3, p. 156–167, mar. 2009.

LI, H.; LI, B. PRP as a new approach to prevent infection: preparation and in vitro antimicrobial properties of PRP. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 74, 2013.

LISBOA, F. P. et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils Against Endometritis-Causing Microorganisms in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 110, 1 mar. 2022.

LONCAR, K. D. et al. In Vitro Biofilm Disruption and Bacterial Killing Using Nonantibiotic Compounds Against Gram-Negative Equine Uterine Pathogens. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 53, p. 94–99, jun. 2017.

LU, K.; VON DOLLEN, K. Nonantibiotic therapies for endometritis: what, when, and why. **Clinical Theriogenology**, v. 13, n. 260, 2021.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538–544, 1998.

MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 4, p. 489–496, 2004.

MAZZOCCA, A. D. et al. An in vitro evaluation of the anti-inflammatory effects of platelet-rich plasma, ketorolac, and methylprednisolone. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 29, n. 4, p. 675–683, abr. 2013.

MAZZUCHINI, M. P. et al. Safety of Uterine Lavage with Ozonated Saline in Mares. **Archives of Veterinary Science**, n. 1, p. 88–104, 2022.

MCCUE, P. M.; FERRIS, R. A. **Formulary and Protocols in Equine Reproduction.** [s.l: s.n.].

METCALF, E. S.; SCOGGIN, K.; TROEDSSON, M. H. T. The effect of platelet-rich plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following semen deposition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 498, ago. 2012.

MØLLER NIELSEN, J. et al. **Diagnosis of equine endometritis-Microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility** *Pferdeheilkunde*. [s.l: s.n.].

MOOJEN, D. J. F. et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 3, p. 404–410, mar. 2008.

MORRELL, J. M.; ROCHA, A. A Novel Approach to Minimising Acute Equine Endometritis That May Help to Prevent the Development of the Chronic State. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 6 jan. 2022.

MORRIS, L. H.; MCCUE, P. M.; AURICH, C. Equine endometritis: a review of challenges and new approaches. 2020.

MUNTEANU, C. Use of Coca-Cola drinks in gastric pathology in pediatric patients. **Romanian Journal of Pediatrics**, v. 69, n. 1, p. 27–29, 31 mar. 2020.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 2019.

NEVES, A. P. et al. Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 3–4, p. 314–322, 2007.

NOCERA, P. et al. Importance of broth-enrichment culture in equine endometritis diagnosis. **New Microbiologica**, v. 44, p. 19–23, 2021.

OVERBECK, W.; WITTE, T. S.; HEUWIESER, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1311–1318, 15 abr. 2011.

PERKINS, N. R. Equine Reproductive Pharmacology. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 1999.

PETERSEN, M. R. et al. Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in mares with subclinical endometritis. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 1–2, p. 119–125, 2015.

POTTER, K.; STEVENS, K.; MENZIES-GOW, N. Prevalence of and risk factors for acute laminitis in horses treated with corticosteroids. **Veterinary Record**, v. 185, n. 3, p. 82, 1 jul. 2019.

PYCOCK, J. F. et al. Can mares be classified as resistant or susceptible to recurrent endometritis? **Pferdeheilkunde**, v. 13, n. 5, p. 431–436, 1997.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, J.; KATILA, T. **Use of antimicrobials in the treatment of reproductive diseases in cattle and horses. Reproduction in Domestic Animals** Blackwell Publishing Ltd, , 2014.

RASMUSSEN, C. D. et al. Equine Infectious Endometritis-Clinical and Subclinical Cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 95–104, 2015.

- RAVAIOLI, V. et al. Infectious Endometritis in Mares: Microbiological Findings in Field Samples. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 112, p. 103913, maio 2022.
- REGHINI, M. F. S. et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 516–522, 18 set. 2015.
- REPCIUC, C. C.; CRECAN, C. M.; OANA, L. I. Ozone Therapy in Veterinary Medicine. 2016.
- REX, J. H. et al. **Designing development programs for non-traditional antibacterial agents.** **Nature Communications** Nature Publishing Group, , 1 dez. 2019.
- ROECKNER, J. T. et al. Povidone-iodine 1% is the most effective vaginal antiseptic for preventing post-cesarean endometritis: a systematic review and network meta-analysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 221, n. 3, p. 261.e1-261.e20, 1 set. 2019.
- SAKAGUCHI, S. **Regulatory T Cells: Minireview Key Controllers of Immunologic Self-Tolerance selection are further subjected to control in the periph-ery; T cells can be rendered anergic (i.e., functionally inactivated without death) or deleted upon encounter with self-antigens in the periphery. In addition to these “passive” mechanisms of controlling self-reactive TCell.** [s.l: s.n.].
- SCOGGIN, C. F. Endometritis: Nontraditional Therapies. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 499–511, dez. 2016a.
- SCOTT, C. J. **A review of fungal endometritis in the mare.** **Equine Veterinary Education** Equine Veterinary Journal Ltd, , 1 ago. 2020.
- SEGABINAZZI, L. G. T. M. et al. Intrauterine blood plasma platelet-therapy mitigates persistent breeding-induced endometritis, reduces uterine infections, and improves embryo recovery in Mares. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, 1 maio 2021a.
- SERRA-MAIA, R. et al. Mechanism and Kinetics of Hydrogen Peroxide Decomposition on Platinum Nanocatalysts. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 25, p. 21224–21234, 27 jun. 2018.
- TONGU, E. A. DE O. et al. Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares. **Theriogenology**, v. 169, p. 1–8, 15 jul. 2021.
- TRAUB-DARGATZ, J. L.; SALMAN, M. D.; VOSS, J. L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 198, n. 10, p. 1745–7, 15 maio 1991.
- TROEDSSON, M. H. T. et al. **Smooth Muscle Electrical Activity in the Oviduct, and the Effect of Oxytocin, Prostaglandin F 2a , and Prostaglandin E 2 on the Myometrium and the Oviduct of the Cycling Mare 1BIOL REPROD MONO.** [s.l: s.n.]. Disponível em:
<https://academic.oup.com/biolreprod/article/52/monograph_series1/475/5050346>.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine Clearance and Resistance to Persistent Endometritis in the Mare. **Theriogenology**, p. 461–471, 1999.

TROEDSSON, M. H. T. et al. Interaction between equine semen and the endometrium: The inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3–4, p. 273–278, 2001a.

TROEDSSON, M. H. T. et al. **Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen** *Animal Reproduction Science*. [s.l.: s.n.].

TROEDSSON, M. H. T. et al. Effect of Perioovulatory Prostaglandin F2a on Pregnancy Rates and Luteal Function in the Mare. **Theriogenology**, 2001c.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; CRABO, B. G. Sperm transport and survival in the mare. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 905–915, abr. 1998.

TROEDSSON, M. H. T.; NIELSEN, J. M. Non-antibiotic treatment of equine endometritis. **Pferdeheilkunde**, v. 34, n. 1, p. 17–22, 1 jan. 2018.

TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M. Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 1, p. 8–12, 1 mar. 2016.

TROTTER, G.; MCKINNON, A. Surgery for Abnormal Vulvar and Perineal Conformation in the Mare. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 4, 1988.

TROWBRIDGE, C. C. et al. Use of platelet gel and its effects on infection in cardiac surgery. **The journal of extra-corporeal technology**, v. 37, n. 4, p. 381–6, dez. 2005.

UGAZIO, E. et al. **Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques.** *Molecules* MDPI AG, , 14 jan. 2020.

VANNI, I. **Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades dos Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas pela técnica de Lisado Plaquetário.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2016.

VARKOUHI, A. et al. Extracellular Vesicles from Interferon- γ -primed Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reduce Escherichia coli-induced Acute Lung Injury in Rats. **Anesthesiology**, v. 130, p. 778–790, 2019.

WOLF, C. A. et al. Uterine nitric oxide levels and isofluopredone treatment effect in mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 100–104, 1 abr. 2016.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Endometritis in old mares. **Pferdeheilkunde**, v. 30, p. 53–56, 2014.

YOU, J.; FU, Z.; ZOU, L. **Mechanism and Potential of Extracellular Vesicles Derived From Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Infectious Diseases.** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 26 out. 2021.

YOUNGQUIST, R. S. et al. The effects of EDTA-Tris Infusion on the Equine Endometrium. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 593–599, 1984.

YUAN, T.; ZHANG, C.; ZENG, B. Treatment of chronic femoral osteomyelitis with platelet-rich plasma (PRP): A case report. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 38, n. 2, p. 167–173, abr. 2008.

ZHAO, Y. et al. Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Isolates from Donkey Uterine Infections, 2018–2021. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2022.

CAPÍTULO 2

In vitro Antimicrobial Activity of Novel Non-Traditional Therapies for Infectious Endometritis in Mares

Mariana P. Mazzuchini^{1,2}, Lorenzo G.T.M. Segabinazzi³, Jessica I. de Castro⁴, Marco A. Alvarenga¹ and Igor F. Canisso^{1,2*}

¹ Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

² College of Veterinary Medicine, University of Illinois Urbana Champaign, IL, USA.

³ Ross University School of Veterinary Medicine, Basseterre, St. Kitts, West Indies.

⁴ University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Correspondence: canisso@illinois.edu.

Abstract: Endometritis is the leading cause of subfertility in horses and one of the major causes of indiscriminate use of antimicrobials in veterinary medicine. Because of this, alternative therapies to treat endometritis are essential to limit the usage of antibiotics and prevent the increase in antimicrobial resistance. This study aimed to assess the *in vitro* activity of non-traditional therapies used in clinical practice against common microorganisms causing infectious endometritis in horses. A broth microdilution technique was performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of 50, 90, and 100 percent of microorganisms and the percentage of inhibition (PI) of each therapy against each microorganism (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida* sp). The MIC 50 and 90 were determined using non-linear regression, while MIC 100 was assessed using the resazurin dye technique. The serial PI was evaluated for each therapy using a spectrophotometer. All the treatments demonstrated a PI higher than positive controls for all microorganisms; however, the only therapies that presented a MIC 100 value were hydrogen peroxide and platelet-rich and -poor plasma. In conclusion, hydrogen peroxide and platelet-rich and -poor plasma might be alternatives to traditional therapies for endometritis that would support a reduction in antibiotic use.

Keywords: antibiotics; bacteria; fungus; infection; equine

Citation: Mazzuchini, M.P.; Segabinazzi, L.G.; de Castro, J.I.; Alvarenga, M.A.; Canisso, I.F. *Antimicrobial Activity of Novel Non-Traditional Therapies for Infectious Endometritis in Mares*. *Antibiotics* **2023**, *11*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Endometritis is the leading cause of subfertility in domesticated animals and the third most common veterinary problem in equine clinical practice [1,2]. Endometritis can be classified as infectious or non-infectious, acute or chronic, and clinical or subclinical [3]. Of the infectious causes, bacteria predominate, whereas fungal agents are responsible for less than 10% of cases [4]. Bacterial agents commonly associated with endometritis in mares include *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* [3]. Fungal endometritis is commonly linked with *Candida* sp. and less frequently with *Aspergillus* sp [3,5], and in a small fraction of cases, mixed bacterial and fungal infections can be detected [5,6]. While these and other microorganisms can be associated with all types of endometritis, there appear to be associations between species and varieties of endometritis. For instance, although *Streptococcus zooepidemicus* can cause deep-seated dormant subclinical chronic infections, it seems primarily associated with acute clinical endometritis [1]. On the other hand, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* are more likely to be associated with challenging-to-treat chronic endometritis [2–4].

Treatment for infectious endometritis involves a multi-modal approach, entailing various combinations of uterine lavage using crystalloid solutions (with or without the

addition of antiseptics), ecobolic agents such as oxytocin or PGF2 α analogs, steroidal and non-steroidal anti-inflammatories, and uterine infusions or systemic administrations of antibiotics [5]. While most mares respond to these traditional therapies for endometritis, some fail to respond to these treatments, which has often been linked with antimicrobial resistance [6]. Therefore, in recent years extensive work has been carried out to develop alternative therapies to traditional therapeutic protocols that include antibiotics [7–9].

[10] Non-traditional therapies have antimicrobial properties, the ability to break the biofilm ordinarily present in the endometrium lining of chronically infected mares, inhibit bacterial attachment and growth, and bind to endo/exotoxins produced by infectious agents [11]. Common agents include acetylcysteine, hydrogen peroxide, dimethyl-sulfoxide, and iodine solution [7,12,13]. Other treatment protocols include chemically irritant products like kerosene and hypertonic solutions like dextrose [14]. Additional non-traditional therapies include biological products such as hyper-immune plasma, blood plasma, mycobacterium cell wall-extract, stem cells and its by-products, and platelet-rich plasma [15–20]; some of these products are administered *in utero*, others systemically. The biologic products such as platelet-rich plasma have been gaining popularity in clinical practice for its anti-inflammatories and natural antimicrobial properties [15], [17], [20–23]. Despite extensive efforts by various clinicians and research groups to develop practical applications for non-traditional therapies, minimal efforts have been focused on understanding the mechanism of action and antimicrobial properties of non-traditional therapies for endometritis in mares.

Moreover, the tightening governmental policies in several countries have put pressure on developing novel antibiotic-free therapies for diseases in horses and livestock [10]. In addition, the combination of ever-evolving antimicrobial resistance and tighter regulations on the use of antibiotics in domestic animals warrants the development of novel therapies for endometritis and other diseases of veterinary interest. Therefore, this study aimed to assess the *in vitro* antimicrobial properties of non-traditional therapies currently used in clinical practice against common microorganisms associated with endometritis in mares. We hypothesized that antimicrobial properties vary with the therapy and the infectious agent in a dose-dependent manner.

2. Results

2.1. Microorganism characterization

Using MALDI-TOF mass spectrometry, the microorganisms were identified as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*; all these microorganisms were chosen because they are commonly associated with chronic and difficult-to-treat infectious endometritis and are the type of infections that seemingly benefit from non-traditional therapies. The identity of microorganisms was also determined by similarity after 16s rDNA analysis, the specific whole DNA sequences, and a minimum of 94.5% of similarity was used for identification as previously described [24]. While it was not the objective of the study to compare techniques (i.e., MALDI-TOF vs. 16s rDNA sequencing), the two techniques were applied to characterize the microorganisms tested in the study. Due to issues with sample degradation during a freezer outage, *Candida albicans* identification using the 16s rDNA technique was not possible, whereas remaining microorganisms were properly identified by 16s rDNA sequencing (Table 1).

Table 1. – Results of MALDI-TOF mass spectrometry and 16s rDNA sequencing.

MALDI-TOF MS	16s rDNA
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus argenteus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia ruysiae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp.

<i>Candida albicans</i>	<i>quasipneumoniae</i> NP	
NP, not performed due to storage issues.		92
After 16s rDNA and similarity comparison, <i>Staphylococcus aureus</i> identified by MALDI-TOF, was classified as <i>Staphylococcus</i> genera, being <i>Staphylococcus argenteus</i> MSHR1132, <i>Staphylococcus schweitzeri</i> FSA084, and <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> ATCC 35844 the most similar species, with 99.03%, 98.97%, and 98.97% of similarity, respectively (S-Figure 1). <i>Escherichia coli</i> identified on MALDI-TOF, by similarity comparison, was classified as an <i>Escherichia</i> genera, and <i>Escherichia ruysiae</i> 98.75% , <i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903, 98.54% and <i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (CU928158) 98.47%, respectively (S-Figure 2). <i>Pseudomonas aeruginosa</i> was identified as <i>Pseudomonas</i> genera, being <i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 99.51% similar, <i>Pseudomonas otitidis</i> MCC1033 98.18% and <i>Pseudomonas lalkuanensis</i> PE08 97.69%, respectively (S-Figure 3). <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 16s rDNA identification showed similarity with <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> 01A030, <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> 07A044 and <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> ATCC 13884 of 98.7%, 98.56%, and 98.49%, respectively (S-Figure 4).		93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106

2.2. Experiment 1 Non-biological alternative therapies for equine endometritis 107

2.2.1. Percentage of inhibition (PI) 108

The percentage of inhibition of each non-biological alternative therapy was compared for each microorganism. There were effects of treatment, dilution, and microorganisms ($P<0.05$). For *Staphylococcus* sp., hydrogen peroxide returned the highest PIs, and was superior to other alternative therapies ($P<0.05$) . All therapies' first dilution (1:2) was different when compared with positive controls (Table S1). The PI for *Escherichia* sp. using hydrogen peroxide showed the highest PI compared to the other treatments. However, a difference was observed only when hydrogen peroxide was compared with iodine and dimethyl sulfoxide in all dilutions ($P<0.05$). Furthermore, all therapies at the first dilution (1:2) were different when compared with positive controls ($P<0.05$, Table S2). Hydrogen peroxide had the most significant PI values for *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., and *Candida* sp., being superior to all other treatments in all dilutions ($P<0.05$, Table S3; Table S4; Table S5). 109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120

The PI capacity of each treatment was compared between each microorganism and dilution effects. Hydrogen peroxide showed the same inhibitory effect against all microorganisms ($P>0.05$), introducing a relevant outcome in comparison with microorganisms' growth in positive controls ($P<0.05$, Table 2). Lactated Ringer was more efficient in inhibiting *Escherichia* sp. when compared to the other microorganisms ($P<0.05$). In addition, the PI of all dilutions was different when compared with positive controls ($P<0.05$, Table 3). 121
122
123
124
125
126

Table 2. – Percentage of inhibition of Hydrogen peroxide against *Staphylococcus* sp. (*Staph*), *Escherichia* sp. (*E.coli*), *Pseudomonas* sp. (*Pseudo*), *Klebsiella* sp. (*Kleb*) and *Candida* sp. (*Candida*). 127
128

	Hydrogen Peroxide				
	Microorganisms				
	<i>Staph</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudo</i>	<i>Kleb</i>	<i>Candida</i>
1:2	98 ^A	99 ^A	99 ^A	100 ^A	90 ^A
1:4	100 ^A	99 ^A	98 ^A	100 ^A	99 ^A
1:8	100 ^A	99 ^A	97 ^A	100 ^A	99 ^A
1:16	100 ^A	98 ^A	97 ^A	100 ^A	99 ^A
1:32	100 ^A	97 ^A	1 ^A	100 ^A	99 ^A
1:64	100 ^A	20 ^A	0 ^A	100 ^A	98 ^A
1:128	98 ^A	7 ^A	0 ^A	99 ^A	98 ^A

C+ 0^B 0^B 0^B 0^B 0^B

Superscripts represent differences between each dilution of Hydrogen Peroxide (H₂O₂) (^{A,B}). 129

Table 3. - Percentage of inhibition of Lactated Ringer against *Staphylococcus* sp. (*Staph*), *Escherichia* sp. (*E. coli*), *Pseudomonas* sp. (*Pseudo*), *Klebsiella* sp. (*Kleb*) and *Candida* sp. (*Candida*). 130
131

Lactated Ringer					
Microorganisms					
	<i>Staph</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudo</i>	<i>Kleb</i>	<i>Candida</i>
1:2	23 ^{Aa}	44 ^{Ab}	14 ^{Aa}	34 ^{Aa}	25 ^{Aa}
1:4	8 ^{Aa}	26 ^{Ab}	0 ^{Aa}	9 ^{Aa}	5 ^{Aa}
1:8	0 ^{Aa}	21 ^{Ab}	11 ^{Aa}	0 ^{Aa}	5 ^{Aa}
1:16	0 ^{Aa}	20 ^{Ab}	17 ^{Aa}	0 ^{Aa}	13 ^{Aa}
1:32	0 ^{Aa}	39 ^{Ab}	21 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}
1:64	4 ^{Aa}	24 ^{Ab}	4 ^{Aa}	19 ^{Aa}	0 ^{Aa}
1:128	0 ^{Aa}	44 ^{Ab}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}
C+	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B

Superscripts represent differences between each microorganism (^{a,b}) and each dilution (^{A,B}) of Lactated Ringer (LRS). 132
133

Ozone carried out the same effect in all dilutions (P>0.05). However, the inhibitory effect against *Escherichia* sp. was superior to the other microorganisms (P<0.05). However, no differences between treated wells and positive controls were observed in either microorganism (Table 4). The iodine bacteriostatic effect introduced the same outcome for all microorganisms and dilutions (P>0.05) (Table 5). Dimethyl Sulfoxide's PI was superior at the first dilution (1:2) when compared to the others and positive control (P<0.05) (Table 6). 134
135
136
137
138
139
140

Table 4. - Percentage of inhibition of Ozone against *Staphylococcus* sp. (*Staph*), *Escherichia* sp. (*E. coli*), *Pseudomonas* sp. (*Pseudo*), *Klebsiella* sp. (*Kleb*) and *Candida* sp. (*Candida*). 141
142

Ozone					
Microorganisms					
	<i>Staph</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudo</i>	<i>Kleb</i>	<i>Candida</i>
1:2	3 ^a	37 ^b	0 ^a	32 ^a	6 ^a
1:4	8 ^a	39 ^b	0 ^a	15 ^a	1 ^a
1:8	1 ^a	39 ^b	0 ^a	2 ^a	9 ^a
1:16	0 ^a	38 ^b	7 ^a	0 ^a	13 ^a
1:32	0 ^a	47 ^b	0 ^a	0 ^a	9 ^a
1:64	9 ^a	21 ^b	7 ^a	0 ^a	14 ^a
1:128	13 ^a	36 ^b	3 ^a	0 ^a	0 ^a
C+	0	0	0	0	0

Superscripts represent differences between each microorganism (^{a,b}) of Ozone. 143

Table 5. - Percentage of inhibition of Ozone against *Staphylococcus* sp. (*Staph*), *Escherichia* sp. (*E. coli*), *Pseudomonas* sp. (*Pseudo*), *Klebsiella* sp. (*Kleb*) and *Candida* sp. (*Candida*). 144
145

Iodine					
Microorganisms					
	<i>Staph</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudo</i>	<i>Kleb</i>	<i>Candida</i>
1:2	67	53	1	0	63
1:4	63	17	0	0	43
1:8	22	46	0	0	6
1:16	0	11	0	0	0

1:32	28	13	0	0	0
1:64	6	1	0	0	0
1:128	0	0	0	0	0
C+	0	0	0	0	0

Table 6. - Percentage of inhibition of Dimethyl Sulfoxide against *Staphylococcus* sp. (*Staph*), *Escherichia* sp. (*E. coli*), *Pseudomonas* sp. (*Pseudo*), *Klebsiella* sp. (*Kleb*) and *Candida* sp. (*Candida*).

	Dimethyl Sulfoxide				
	Microorganisms				
	<i>Staph</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudo</i>	<i>Kleb</i>	<i>Candida</i>
1:2	35 ^A	62 ^A	95 ^A	75 ^A	72 ^A
1:4	0 ^B	0 ^B	8 ^B	11 ^B	6 ^B
1:8	0 ^B	0 ^B	0 ^B	1 ^B	0 ^B
1:16	0 ^B	0 ^B	0 ^B	6 ^B	0 ^B
1:32	0 ^B	0 ^B	0 ^B	15 ^B	0 ^B
1:64	0 ^B	0 ^B	0 ^B	2 ^B	0 ^B
1:128	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B
C+	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B

Superscripts represent differences between each dilution of Dimethyl Sulfoxide (^{A,B}).

2.2.2. Minimal inhibitory concentration (MIC)

The MIC of 50 and 90 percent of the microorganisms is presented in percentage for each non-biological alternative therapy (Table 7).

Table 7. – Minimum inhibitory concentration 50% and 90% of non-biological alternative therapies.

	H ₂ O ₂	LRS	O ₃	Iodine	DMSO
<i>Staphylococcus</i> sp.	0.06	95	0.2	1.2	-
<i>Escherichia</i> sp.	0.19	0.01	-	2	20
<i>Pseudomonas</i> sp.	0.5	-	0.02	2	13.7
<i>Klebsiella</i> sp.	0.1	65.8	69.7	-	15.8
<i>Candida</i> sp.	9.9	108.3	-	1.6	16.8
	H ₂ O ₂	LRS	O ₃	Iodine	DMSO
<i>Staphylococcus</i> sp.	0.07	306.4	-	3.6	-
<i>Escherichia</i> sp.	0.3	-	-	4.7	20.1
<i>Pseudomonas</i> sp.	0.6	-	-	2	18.2
<i>Klebsiella</i> sp.	0.1	164	183.5	-	25.4
<i>Candida</i> sp.	5	-	-	3.8	25.3

(H₂O₂) Hydrogen Peroxide; (LRS) Lactated Ringer; (O₃). Ozonated Lactated Ringer; (DMSO) Dimethyl Sulfoxide.

MIC100 was determined using the resazurin sodium salt solution. Therefore, only the wells without oxidation of resazurin dye were considered as a MIC100 values. Experiment 1 was performed in triplicates, and when one of the three wells at the same concentration presented an oxidation in resazurin color, MIC100 was considered the previous dilution to that concentration (Figure 1).

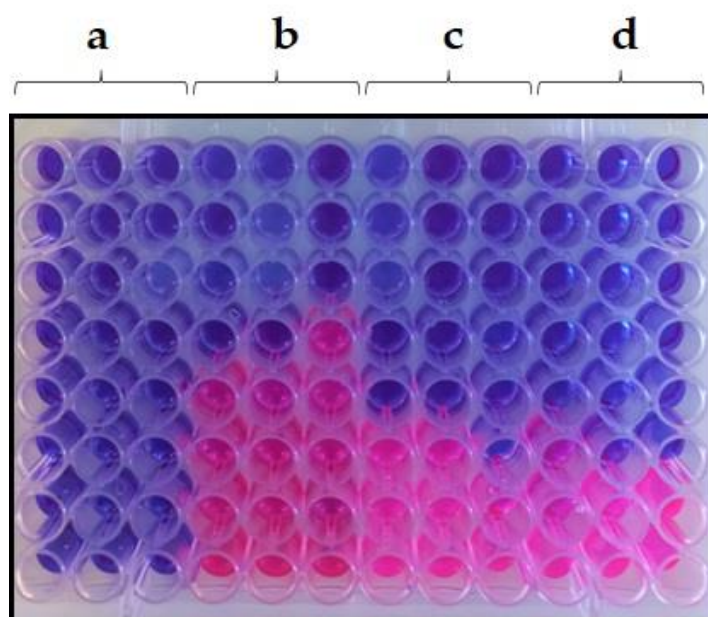


Figure 1. The minimum inhibitory concentration of hydrogen peroxide using the resazurin dye technique. Determination of minimal inhibitory concentration of hydrogen peroxide that was able to inhibit 100% of each microorganism's activity. (a) Negative control containing Mueller-Hinton broth and hydrogen peroxide in each serial microdilution. (b) *Pseudo'* triplicate, bacterial growth was inhibited in the three wells until 1:8 microdilution. (c) *Kleb'* triplicate, bacterial was inhibited until 1:32 dilution. (d) *Candida'* triplicate was inhibited until 1:32 dilution.

Hydrogen peroxide was the only therapy that presented MIC100 results, inhibiting *Staphylococcus* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. and *Candida* sp. However, different concentrations were observed for each microorganism (Table 8).

Table 8. – Minimum inhibitory concentrations of hydrogen peroxide that were able to inhibit 100% of microorganisms' growth.

	H ₂ O ₂
<i>Staphylococcus</i> sp.	0.2
<i>Escherichia</i> sp.	1.25
<i>Pseudomonas</i> sp.	1.25
<i>Klebsiella</i> sp.	0.38
<i>Candida</i> sp.	0.38

2.3. Experiment 2 – Biological alternative therapies.

2.3.1. Platelet concentrates

Platelet-rich and platelet-poor plasma were obtained from six healthy mares. The experiment was performed in triplicates (i.e., three platelet concentrates per mare) (Table 9).

Table 9. – Platelet concentrates and platelet and white blood cell counts.

Mare	Basal concentration		Platelet-rich plasma		Platelet-poor plasma	
	PLT	WBC	PLT	WBC	PLT	WBC
1	200±8 ^a	7.2±0.3	1358±169 ^a	0.67±0.6	36±4 ^a	0
2	143±3 ^b	7±0.2	1027±54 ^b	0.46±0.8	26±3 ^a	0
3	165±10 ^b	8.4±0.5	957±81 ^b	0.43±0.1	28±4 ^a	0
4	144±17 ^b	12±0.2	899±4 ^b	3.1±2	35±8 ^a	0.06±0.03
5	191±4 ^{ac}	7.2±0.3	1113±35 ^{ab}	0.07±0.1	60±4 ^b	0

6	166±6 ^{bc}	9.7±0.1	983±68 ^b	0.07±0.07	37±7 ^a	0
---	---------------------	---------	---------------------	-----------	-------------------	---

Superscripts (^{a-c}) represent significant differences ($P<0.05$) between platelet concentrations for each mare. PLT represents platelet concentration $\times 10^3$ per microliter, and WBC represents white blood cells $\times 10^3$ per microliter.

2.3.2. Percentage of inhibition (PI)

Percentages of inhibition were compared for each microorganism between different dilutions. An association between the highest concentrations of platelet-rich plasma and the increase in antimicrobial activity was observed. The first dilution (1:2) was different from the positive control for all microorganisms ($P<0.05$). Additionally, at the first dilution, *Escherichia* sp. was inhibited in total for all tested PRP (Table 10).

Table 10. Percentage of inhibition of platelet-rich plasma against each microorganism.

	Platelet-rich plasma dilution							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	C+
<i>Staphylococcus</i> sp.	79±4 ^a	34±6 ^{ac}	14±4 ^{ac}	10±4 ^{bc}	3±2 ^b	4±2 ^b	4±2 ^b	0 ^b
<i>Escherichia</i> sp.	100 ^a	97±2 ^a	76±7 ^a	26±7 ^b	20±5 ^b	2±1 ^b	5±3 ^b	0 ^b
<i>Pseudomonas</i> sp.	83±3 ^a	54±6 ^b	17±7 ^c	3±2 ^c	1±1 ^c	5±3 ^c	4±3 ^c	0 ^c
<i>Klebsiella</i> sp.	58±7 ^a	26±7 ^a	12±5 ^b	5±2 ^b	9±4 ^b	3±1 ^b	4±2 ^b	0 ^b
<i>Candida</i> sp.	37±5 ^a	25±2 ^a	2±2 ^b	4±2 ^b	4±2 ^b	2±1 ^b	4±2 ^b	0 ^b

Data expressed as Mean ± SEM. Superscripts (^{a-c}) represent differences ($P<0.05$) between PI when compared to each dilution of PRP.

In addition, platelet-poor plasma demonstrated antimicrobial activity against all microorganisms, effectively inhibiting *Escherichia* sp. at 92%. Moreover, the inhibition capacity seems to be associated with the highest concentrations of platelet-poor plasma, with the first dilution (1:2) different ($P<0.05$) from positive control in all microorganisms (Table 11).

Table 11. Percentage of inhibition of platelet-poor plasma against each microorganism.

	Platelet-poor plasma dilution							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	C+
<i>Staphylococcus</i> sp.	45±6 ^a	25±5 ^{ac}	11±3 ^{bc}	2±1 ^b	1±1 ^b	1±1 ^b	1±1 ^b	0 ^b
<i>Escherichia</i> sp.	92±3 ^a	64±8 ^{ac}	59±9 ^{bc}	19±7 ^b	5±3 ^d	2±1 ^d	2±1 ^d	0 ^d
<i>Pseudomonas</i> sp.	67±4 ^a	51±4 ^a	17±5 ^b	7±3 ^b	8±3 ^b	6±3 ^b	4±2 ^b	0 ^b
<i>Klebsiella</i> sp.	22±6 ^a	19±4 ^a	14±4 ^a	7±3 ^b	5±3 ^b	3±2 ^b	4±2 ^b	0 ^b
<i>Candida</i> sp.	14±3 ^a	12±3 ^{ab}	1±1 ^a	0 ^b	1±1 ^c	1±1 ^c	3±2 ^{bc}	0 ^{bc}

Data expressed as Mean ± SEM. Superscripts (^{a-d}) represent significant differences ($P<0.05$) between PI when comparing each dilution of PPP.

When comparing the inhibition effect of platelet-rich and platelet-poor plasma, significant differences were observed between the first dilution (1:2) of PRP when compared with all PIs of PPP for *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Candida* sp. ($P<0.0001$) and *Pseudomonas* sp. ($P=0.0169$). However, for *Escherichia* sp., at the first dilution (1:2), PRP and PPP demonstrated the same antimicrobial effect ($P=0.9702$). In addition, the effect of the second dilution of PRP was increased when compared to all PPP dilutions for *Staphylococcus* sp. ($P<0.0001$), *Escherichia* sp. ($P<0.0001$), and *Candida* sp. ($P<0.05$). However, against *Pseudomonas* sp. and *Klebsiella* sp., PRP and PPP demonstrated the same effect at 1:4 ($P>0.9999$ and $P=0.7986$, respectively).

The 1:8 PRP dilution was more effective for *Staphylococcus* sp. when compared with PPP at 1:32 ($P=0.0372$), 1:64 ($P=0.0181$), and 1:128 ($P=0.0408$). In addition, for *Escherichia* sp., 1:8 PRP dilution was different from all concentrations of PPP ($P<0.05$) except PPP at 1:8 ($P=0.0624$). For *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., and *Candida* sp. there were no differences

between the antimicrobial effect of PRP at 1:8 and all other dilutions of PPP ($P>0.05$). The inhibitory effect of PRP against *Escherichia* sp. at 1:16 dilution was increased when compared with 1:16, 1:32, 1:64, and 1:128 PPP dilutions ($P<0.05$). For the other microorganisms, there were no differences between 1:16 dilutions with 1:32, 1:64, 1:128, and positive controls ($P>0.05$). Both PRP and PPP antimicrobial effect seems to be associated with increased concentrations of plasma, representing the best inhibitory effects at the initial dilutions.

2.3.4. Minimal inhibitory concentration (MIC)

The MIC of PRP and PPP of 50% and 90% of each microorganism were determined using the means of PI of each mare's triplicate. When comparing the MIC 50 and MIC 90 of PRP and PPP obtained from each mare, there were no differences between platelet concentrations ($P>0.05$) (Table 12; Table 13).

Table 12. – Minimum inhibitory concentration 50% and 90% of each individual platelet-rich plasma.

MIC 50 (PLT $\times 10^3/\mu\text{l}$)						
Mare						
	1	2	3	4	5	6
<i>Staphylococcus</i> sp.	562.5	407.4	210.4	241.7	276.3	323.5
<i>Escherichia</i> sp.	113.7	80.3	73.1	84.81	105.7	102.4
<i>Pseudomonas</i> sp.	447.4	-	330.6	294.2	276.5	213
<i>Klebsiella</i> sp.	859.4	327.2	405.8	214.8	-	896.6
<i>Candida</i> sp.	840.3	519.2	444.2	493.7	-	485.2
MIC 90 (PLT $\times 10^3/\mu\text{l}$)						
Mare						
	1	2	3	4	5	6
<i>Staphylococcus</i> sp.	745.9	740.4	1464	524.4	327.5	1084
<i>Escherichia</i> sp.	231.1	142.4	108.8	104.2	208.6	141.1
<i>Pseudomonas</i> sp.	1120	-	759.2	518	341.4	302.9
<i>Klebsiella</i> sp.	1202	422.1	2453	1319	-	-
<i>Candida</i> sp.	1951	523.7	588.2	928.9	-	1427

Table 13. – Minimum inhibitory concentration 50% and 90% of each individual platelet-poor plasma.

MIC 50 (PLT $\times 10^3/\mu\text{l}$)						
Mare						
	1	2	3	4	5	6
<i>Staphylococcus</i> sp.	23.1	13.1	11.8	9.2	29.1	-
<i>Escherichia</i> sp.	3.7	2.1	3.18	6.1	16.7	8.9
<i>Pseudomonas</i> sp.	17.3	1.8	1.48	6.6	13	18.4
<i>Klebsiella</i> sp.	599.3	36.1	9.4	23.5	35.7	0
<i>Candida</i> sp.	77.8	8904	233.3	-	-	28.2
MIC 90 (PLT $\times 10^3/\mu\text{l}$)						
Mare						
	1	2	3	4	5	6

<i>Staphylococcus</i> sp.	154.7	-	70.7	31.8	64.9	-
<i>Escherichia</i> sp.	20.6	23.3	100.9	27.5	40.2	18.2
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	23.5	100.6	50.2	22.1
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	167.9	-
<i>Candida</i> sp.	-	-	-	-	-	59.1

The MIC100 determined using the resazurin dye technique showed different results for each mare's PRP and PPP. *Escherichia* sp. was the only microorganism that was able to be inhibited in all PRP and PPP. In addition, *Staphylococcus* sp. MIC 100 was determined in 16% of PRP and PPP, *Klebsiella* 16% of PPP, and *Pseudomonas* sp. at 66% of PPP and 33% of PRP (Table 14). *Candida* sp. was not completely inhibited using alternative biological therapies.

Table 14. - MIC100 (Mean $\pm$ SEM) of platelet-rich (PRP) and platelet-poor (PPP) for each animal based on platelet concentration ($\times 10^3/\mu\text{l}$).

	Mare											
	1		2		3		4		5		6	
	PRP	PPP	PRP	PPP	PRP	PPP	PRP	PPP	PRP	PPP	PRP	PPP
<i>Staphylococcus</i> sp.	679 $\pm$ 84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19 $\pm$ 4
<i>Escherichia</i> sp.	679 $\pm$ 84	18 $\pm$ 2	257 $\pm$ 13	13 $\pm$ 2	479 $\pm$ 40	14 $\pm$ 2	449 $\pm$ 2	18 $\pm$ 4	557 $\pm$ 17	30 $\pm$ 2	492 $\pm$ 34	19 $\pm$ 4
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	13 $\pm$ 2	479 $\pm$ 40	14 $\pm$ 2	449 $\pm$ 2	18 $\pm$ 4	-	30 $\pm$ 2	-	19 $\pm$ 4
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	-	14 $\pm$ 2	-	18 $\pm$ 4	-	-	-	-

3. Discussion

This study was set forth to assess the *in vitro* efficacy of non-traditional biological and non-biological therapies commonly used in broodmares' clinical practice. Despite the widespread use in veterinary medicine, there is a lack of studies determining the antimicrobial properties of these agents against microorganisms causing difficult-to-treat chronic endometritis in mares. Non-traditional, non-biological therapies described as a treatment for endometritis in mares include hydrogen peroxide, dimethyl sulfoxide, and iodine solutions [4,26]. Additionally, non-traditional biological compounds, including plasma, platelet-rich plasma, mycobacterium cellular extracts, and stem cells, have been used to modulate inflammatory uterine response in mares and have demonstrated the ability to mitigate uterine infections [20,27].

Microorganisms were identified primarily with MALDI-TOF MS technique in the present study. This quick and low-cost method identified a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Candida albicans*. In addition, to further confirm the identification of the microorganisms-causing endometritis, the whole gene sequence of the 16s rDNA gene was performed as previously described [28]. Differences in species characterization observed between both techniques could be justified by differences in database limitations observed on MALDI-TOF MS method [27]. MALDI-TOF MS is an accurate method to identify the *genus* level of microorganisms. However, for species identification, 16s rDNA sequence identification has been described as the more precise technique [28].

The microorganisms tested herein are known to be challenging to treat, and commonly associated with multiple drug resistance and biofilm development, increasing chronic uterine infectious cases [2,29–33]. In addition, therapies tested here have been commonly used in equine reproduction without proof of efficacy. Therefore, this study provides the first evidence-based analysis of the *in vitro* antimicrobial properties, allowing practitioners to make informed decisions about when and what type of therapy can best suit one of the five difficult-to-treat infectious agents tested herein.

3.1. Non-biological alternative therapies for equine endometritis

Hydrogen peroxide showed the best *in vitro* inhibitory effect compared to all tested therapies. The antimicrobial effect of hydrogen peroxide is based on its capacity to inhibit enzymatic processes essential for microorganism survival and the active release of reactive oxygen species that can penetrate cell walls [30]. Uterine infusions of hydrogen peroxide at 3% are recommended to treat infectious endometritis in mares [5,34]. Interestingly, the *in vitro* inhibitory effect of hydrogen peroxide, under the conditions that the experiment was carried out, for *Escherichia* sp. and *Pseudomonas aeruginosa* was 1.25%; *Klebsiella* sp. and *Candida* sp. 0.38% and *Staphylococcus* sp. 0.2%. This finding is highly relevant as it suggests that the current practice of using hydrogen peroxide at 3% may effectively kill microorganisms causing difficult-to-treat chronic endometritis. It also suggests that lower concentrations may be effective; however, since the *in vivo* uterine fluid is way more complex than any *in vitro* culture/testing media, it has been hypothesized that a higher concentration of hydrogen peroxide is needed for uterine infusion due to interactions with biological fluids. In addition, it should be noted that mixed infections are common, and a uterus in dysbiosis often includes adherence of microorganisms onto the infected tissues [4,31]. All microorganisms tested herein can develop biofilm, a complex mixture of extracellular polymeric substances intermingled with microorganisms, which can protect them from the effects of antibiotics and non-traditional therapies. Some of the therapies tested herein, such as DMSO and iodine, are known to break biofilm; however, others have not been tested [4,32]. Hydrogen peroxide seems effective at inhibiting planktonic bacterial growth; however, in *in vivo* models, its antimicrobial properties can be impaired because of the presence of sessile microorganisms and biofilm formation [32,33].

Dimethyl sulfoxide is a solvent known for its anti-inflammatory, bacteriostatic, and antibiofilm properties [38]. As a vehicle, dimethyl sulfoxide is responsible for different roles in cell functions such as molecular binding, autophagy, anti-inflammatory, and antioxidant responses [39]. Because of all these effects, DMSO has been used as an alternative therapy to treat endometritis and induce biofilm disruption in mares [4,5]. Its bacteriostatic effect was reported against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. However, the concentrations of DMSO that inhibited bacterial growth were 20%, 40%, and 15%, respectively [40]. In our study, DMSO with a final concentration of 20% demonstrated a percentual of inhibition of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* at 95%, 75%, and 62%, respectively, suggesting that increased concentrations of DMSO can be effective to inhibit bacterial growth and present a MIC 100 value. Increased concentrations of DMSO, when infused into the uterus, led to endometrial ulceration and inflammation, which recovered in 21 days [41]. Despite that, the current literature recommends uterine lavages in mares using solutions containing 5-20% of DMSO [4, 5, 7, 38, 39].

Iodine is an antiseptic agent commonly used as a wound care agent, which is effective against bacteria, fungi, and viruses [44]. In addition, uterine lavage using iodine solutions is recommended to treat mares presenting with infectious endometritis [4]. However, the iodine 4% solution was unable to display a MIC value in our study, although it reduced 60% of *Staph* and *Candida* growth and 50% of *E. coli* 24 hours after contact with the microorganisms. In another study, iodine 10% showed a clinical bacteriostatic effect against those microorganisms 3 hours after treatment [45]. These findings suggest a time and concentration dependency associated with the effectiveness of this treatment against the tested microorganisms. The Clinical and Laboratory Standards Institute dictates the acceptable standards and validity of susceptibility tests; it states that 16 hours is the minimum time a drug should be in contact to evaluate the inhibitory effect [46]. Besides that, the side effects of iodine infusion should be considered. As an acid solution, povidone-iodine 10% was associated with skin burn development, and infusions using 1% of iodine solutions with chronic inflammatory responses in the endometrium [47–49][47]. Because of this, *in vivo* experiments should be performed to evaluate the inhibitory potential of increased concentrations of iodine solutions and its potential endometrial damage.

Another therapy tested in the present study, the ozone therapy is growing in equine medicine. Studies demonstrated its capacity to decrease chronic laminitis pain and reduce inflammation and infections in mares with endometritis [50–52]. Besides that, uterine lavage using ozonated solution appears to be safe in mares and does not harm the endometrial tissue [53]. Even though ozone is known for its antimicrobial capacity, it was unable to inhibit bacterial growth or cause biofilm disruption [33]. Similarly, in our study, ozonated ringer did not present a significant inhibitory effect. However, it is well known that ozone gas is an unstable and highly reactive molecule. Furthermore, the temperature and the medium directly influence ozone's half-life [54]. Therefore, additional studies evaluating the concentration and stability of this therapy are needed.

3.2. Biological alternative therapies for equine endometritis

Platelet-rich and platelet-poor plasma were able to present a PI for all microorganisms tested in the present study. However, its bacteriostatic effect inhibited all cellular activity and a MIC100 value only for *Escherichia* sp. The lipopolysaccharides present in some strains of *Escherichia* sp. seem to be associated with platelet activation and release of antimicrobial molecules [51]. The antimicrobial effect of platelet-rich and poor plasma appears to be associated with some plasma components, as an inhibition capacity of plasma was observed even with low concentrations of platelets. However, when comparing the percentages of inhibition capacity of platelet-rich and -poor plasma, a significant difference was observed between them. Platelet-rich plasma at the first dilution was more effective than all other platelet-poor dilutions for *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., and *Candida* sp. As a bacteriostatic agent, platelet-poor and platelet-rich plasma present maximum inhibitory effect within the first two hours [52] suggesting that more than one application of plasma products can improve the inhibitory effects of this therapy. The antimicrobial effect seems related to its activation with calcium chloride [15]. The activation of platelets promotes the release of growth factors that have different functions as well as immunomodulatory, anti-inflammatory, antimicrobial, angiogenic, and chemotactic effects [52–54]. In addition, it seems that *in vivo*, the platelet-rich plasma interacts with leukocytes, increasing their ability to deal with pathogens [56].

4. Materials and Methods

The study was conducted from July to December 2021 at the Sao Paulo State University, Campus Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

4.1. Selection of microorganisms

A local private clinical practice donated all isolates used in the study. The microorganisms were obtained from multiparous Crioulo mares, aged 10 to 18 years old, which were open for at least one year. All mares were swabbed during estrus (≥ 35 mm follicle and endometrial edema) and presented clinical signs of endometritis. Clinical endometritis was defined as uterine fluid accumulation (>2 cm in-depth), echogenic and turbid uterine fluid, exacerbated endometrial edema (score 4, scale 0-absent to 4-maximum), short inter-estrus interval, and history of poor fertility [2,4,59,60]. The selected isolates included *Staphylococcus* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., and *Candida* sp. These isolates are the most common microorganisms associated with infectious endometritis in mares [55], [57]. Initially, the microorganisms were identified using classic microbiological methods such as morphology characterization of the colonies, Gram stain technique, and standard biochemistry tests. After isolation and characterization, samples were kept at -80°C in skim milk medium until further use. The Kirby-Bauer antimicrobial susceptibility test was performed against common antimicrobials used in equine clinical practice (ampicillin, ceftriaxone, clindamycin, gentamicin, penicillin, rifampicin, trimethoprim-sulfa, oxytetracycline, enrofloxacin, ceftiofur, ciprofloxacin) and reported for characterization of

the isolates described herein. Anti-fungal sensitivity test was not performed for *Candida* (S-Table 2).

4.2. Maldi-tof and whole rRNA sequencing of the 16S gene

After classic microbiological identification, the isolates were submitted to MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Mass spectra were assessed with an Autoflex Speed (Bruker, Carteret, NJ, USA), calibrated with the *Escherichia coli* DH5 α standard (BTS). The microorganisms had their proteins extracted using a protocol described elsewhere [63]. After that, one microliter of the proteins extracted was dried in a MALDI-TOF target plate at 20 to 22 °C, and an alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid was added. Mass spectrometry identification was performed using the Biotype 3.1 software (Bruker) using a DTUVet MSP database.

In addition, all isolates were submitted to the rDNA 16s to identify the taxonomy and phylogenetic origin of the microorganisms. The genomic DNA (gDNA) was extracted using a commercial kit, and the samples were assessed by integrity, purity, and concentration using agarose gel 1%. DNA polymerase chain reaction used 20 ng of gDNA *Toq* DNA polymerase, 10 X PCR Buffer, MgCl₂, dNTPs, and 27F and 1492R primers. Thermocycling was performed using a thermal cycling LGC XP CYCLER at 94 °C for 5 min, followed by 37 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 10 s, and 72 °C for 1 min, with a final process at 72 °C for 5 min, with positive and negative controls for the PCR. The amplicons were submitted to electrophoresis in agarose 1% gel to verify the presence of fragments to 16s rDNA analysis. For each sample, the sequencing was done by capillary electrophoresis, using the Sanger method in both directions for the 16s rDNA achieved by PCR. The pieces that present low quality of the pairs of electropherograms were removed from each amplicon, considering the nucleotide sequence only one DNA sequence. The 16s rDNA sequence was compared by its genus in a database (Genome Taxonomy Database – GTDB), considering phylogenetical interference for maximum likelihood (ML).

4.3. Broth microdilution assay

Bacterial susceptibility to the therapies was evaluated using a Microdilution Broth Technique standard by the Clinical and Laboratory Standard Institute [46]. Strains of *Staphylococcus* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., and *Candida* sp. were seeded in Brain Heart Agar (BHI) (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil, cod. K25-610008). All plates were kept aerobically at 37 °C for 24 h. After that, a 0.5 McFarland scale was prepared with each microorganism, and another dilution was performed using 100 μ L of 0.5 scale in 900 μ L of MH, achieving a 1.5×10^7 colony-forming unit/mL.

Two 96-well plates were used to perform each assay for each NTT. At first, 100 μ L of a Mueller-Hinton Broth (MH) (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil, cod. K25-610034) was added to each well. After that, 100 μ L the NTT was placed at row A; then a microdilution was performed using a multichannel micropipette until the row G, obtaining a serial dilution of 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, respectively. In the alternative biological therapies (PRP and PPP), 10 μ L of CaCl₂ was added to activate the platelets. Row H served as the positive control, which consisted of pathogens with MH broth; and the three first lanes (1-3) were used as the negative control, consisting of MH broth and NTT in each serial microdilution (1:2 - 1:128). The pathogens were evaluated in triplicates, with 5 μ L of each microorganism's suspension added in three lanes of the plate, obtaining a final concentration of 5.0×10^4 colony-forming unit/mL in each well. The plates were aerobically stored at 37°C for 24 h (Figure 2).

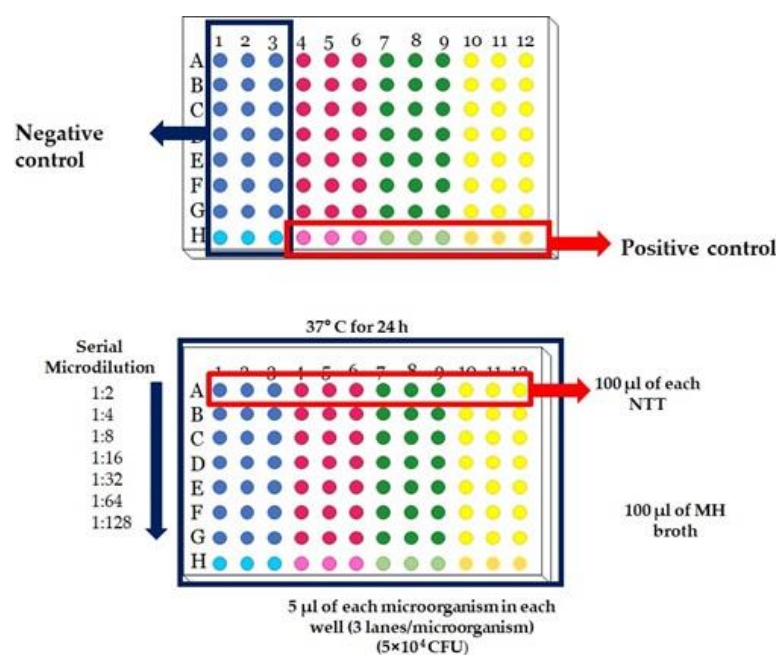


Figure 2. – Broth microdilution assay.

4.4. Percentage of inhibition

The percentage of inhibition (PI) values were based on turbidity measurement comparing each alternative therapy optical density with controls. A SpectraMax M2 spectrophotometer (Molecular Devices, USA) was used to determine bacterial growth and calculate PI. Optical density (OD) was measured at 570 nm. The difference between positive control and the well's OD in each concentration was considered to calculate PI. Furthermore, the negative control's OD was discounted in each well to regard just the bacterial growth without alternative therapy OD (Figure 3). Data are presented in percentages.

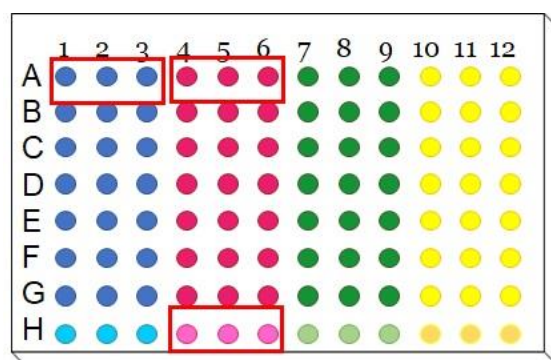


Figure 3. – Determination of PI of each alternative therapy.

4.5. Minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) of each NTT able to inhibit 50% and 90% of microorganisms' growth was determined based on PI data, using a non-linear regression dose-response stimulation mode on GraphPad Prism 9.4.1. The response was based on each NTT concentration in each dilution. For PRP and PPP, just platelet concentration per microliter was considered. For the others NTT, the doses were presented in percentage, representing the final concentration of each therapy in each row. All data were transformed in log (X).

Determination of MIC 100% (i.e., MIC able to inhibit whole microorganism growth) was performed using the resazurin dye technique. Resazurin is a blue dye that reacts with

viable cells, promoting color change by an oxidative reaction. In each well, 10 µl of resazurin sodium salt solution (0.01%) (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil, cod. 199303). After that, the plates were kept at 37°C for one hour[22]. After that, a visual reading was performed to determine any microorganism activity, considering cellular metabolism presence when the dye became “pink” while absence when it remained “blue” (Figure 4).

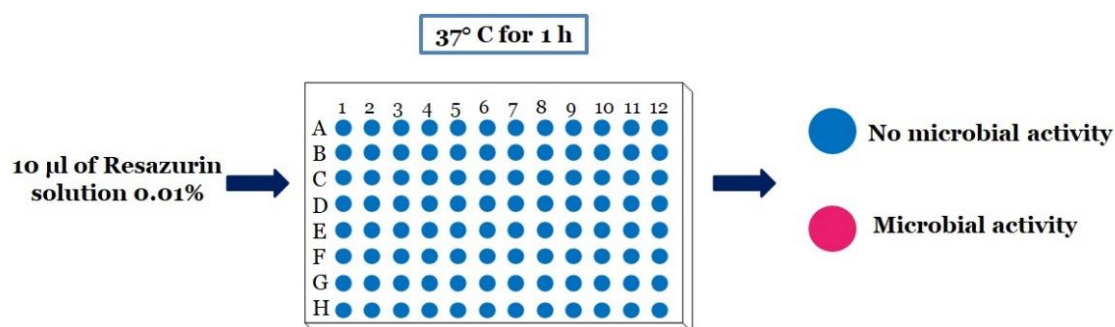


Figure 4. – Determination of MIC100 by resazurin dye technique.

4.5.1. Experiment 1 – Non-biological alternative therapies

The products used in the study and the respective manufacturers are displayed in Table 15; each product's presumed mechanism of action is described in S-Table 1. The concentration and dilutions were chosen according to traditional protocols that have been recommended and are commonly used by veterinary practitioners to perform uterine infusions in mares [14].

Table 15. - Products, source, and working concentrations.

Product	Source	Working concentration
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Vetnil, Brazil	DMSO 40% diluted in LRS
Lactated Ringer's solution (LRS)	Sanobiol, Brazil	N/A
Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	Rioquimica, Brazil	H ₂ O ₂ 10% diluted in LRS
Ozonated LRS (O ₃)	Ozone & Life, Brazil	60 ug/ml of ozone gas for 10 minutes in LRS
Povidone-iodine (Iodine)	Rioquimica, Brazil	4% diluted in saline solution

N/A – not applicable. The product was used pure.

4.5.2. Experiment 2 – Biological alternative therapies

Biological alternative therapies were considered platelet-rich and platelet-poor plasma. Blood samples were collected from six healthy mares (3/mare), aged between 3 and 15 years. The collections were performed using an 18G needle and two 60 mL syringes containing 6 mL of sodium-citrate 3.2% solution each. Then, the blood was homogenized and transferred to 15 ml conical tubes.

A double spin technique was performed to produce plasma products. At the first centrifugation, a 400 G force for 15 minutes was used to separate the plasma from the red blood cells and buffy coat. Then, the plasma was transferred to another 15 ml conical tube, and a second centrifugation was performed using a 1000 G force for 10 minutes. Subsequently, the 90% superior plasma was considered platelet-poor plasma (PPP) and transferred to another conical tube. The 10% of the remaining bottom plasma was homogenized with the pellet and regarded as platelet-rich plasma (PRP) [64]. Blood cell counting was performed using a Mindray BC 2800 Vet® (São Paulo, SP, Brazil) automatic counter to

determine basal, PRP, and PPP cell concentration. To be considered PRP, a minimal concentration of 800×10^3 platelets/microliter was standardized. In contrast, the maximum of 70×10^3 platelets/microliter of plasma was considered for PPP.

4.6. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with Graphpad Prism 9.4.1 (Graphpad Software, California, USA). The Gaussian distribution of the data was evaluated by the Shapiro–Wilk normality test. The PI of PRP and PPP between each dilution was assessed by Kruskal–Wallis test followed by Dunn test. The effect between PRP and PPP against each microorganism was tested by Wilcoxon test. To compare the non-biological NTT's PI for each microorganism, two-way ANOVA and Tukey as a post-hoc test were used to compare the effect of each dilution and each treatment between them. The MIC 50% and 90% of all NTT were determined using a non-linear regression dose-dependent stimulation mode, a robust regression with identification and exclusion of outliers were applicable to decrease the errors. Significance was set at $P < 0.05$ for all tests.

5. Conclusion

In conclusion, biological and non-biological non-traditional therapies demonstrated antimicrobial effects against microorganisms that cause endometritis in mares. For the non-biological treatments, hydrogen peroxide was the only therapy that presented an inhibitory effect of 100% on microorganism growth for all strains. In addition, biological alternative therapies such as PRP and PPP showed a substantial bacteriostatic effect against *Escherichia* sp. However, some particular factors seem to be associated with the microbial inhibition of *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Klebsiella* sp. Because of this, more *in vitro* studies are needed to evaluate if highest concentrations of non-biological alternative therapies are needed to reach antimicrobial activity against microorganisms-causing endometritis in mares. Similarly, other factors that can affect plasma products quality and antimicrobial activity against different microorganisms should be evaluated. After that, *in vivo* studies are essential to assess the safety of the proposed therapies in mares and if the *in vitro* antimicrobial effects of the proposed non-traditional therapies can be translated into *ex vivo* efficient treatments for infectious endometritis in mares and improved fertility.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, **Table S1.** – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Staphylococcus* sp.; **Table S2.** – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Escherichia* sp.; **Table S3.** – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Pseudomonas* sp.; **Table S4.** – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Klebsiella* sp.; **Table S5.** – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Candida* sp.; **Table S6.** – Products and mechanisms of action against microorganisms. **Table S7.** Results of Kirby–Bauer antibiotic sensitivity test for common drugs used in clinical practice. **Figure S1.** *Staphylococcus* phylogenetic tree; **Figure S2.** *Escherichia* sp. phylogenetic tree; **Figure S3.** *Pseudomonas* sp. phylogenetic tree; **Figure S4.** *Klebsiella* sp. phylogenetic tree.

Author Contributions: Mariana P. Mazzuchini contributed with the execution, data analysis, data interpretation, and writing of the manuscript. Lorenzo G. T. M. Segabinazzi contributed to the study design, data analysis, fund acquisition, and manuscript development. Jessica I. Castro contributed to the study execution. Marco A. Alvarenga contributed to the study design and fund acquisition. Igor F. Canisso contributed to the study design, data analysis, and manuscript development.

Funding: This study was financially supported by Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP grant #2021/05152-0).

Institutional Review Board Statement: The Institutional Animal Care Unit Committee approved all procedures described in this study (protocol #0230/2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP protocol #0230/2021), Coordination of Superior Level Staff Improvement of Brazil (CAPES, funding code 001), and Caxias do Sul University (UCS) for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Nielsen, H.J. Endometritis in the Mare: A Diagnostic Study Cultures from Swab and Biopsy. *Theriogenology* **2005**, *106*, 510–518, doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.034.
- Rasmussen, C.D.; Petersen, M.R.; Bojesen, A.M.; Pedersen, H.G.; Lehn-Jensen, H.; Christoffersen, M. Equine Infectious Endometritis-Clinical and Subclinical Cases. *J Equine Vet Sci* **2015**, *35*, 95–104, doi:10.1016/j.jevs.2014.12.002.
- Riddle, W.T.; LeBlanc, M.M.; Stromberg, A.J. Relationships between Uterine Culture, Cytology and Pregnancy Rates in a Thoroughbred Practice. *Theriogenology* **2007**, *68*, 395–402, doi:10.1016/j.theriogenology.2007.05.050.
- Canisso, I.F.; Segabinazzi, L.G.T.M.; Fedorka, C.E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares - a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.
- Ferris, R.A. Therapeutics for Infectious Endometritis: A Clinical Perspective. *Rev. Bras. Reprod. Anim* **2017**, *41*, 175–179.
- Malaluang, P.; Wilén, E.; Lindahl, J.; Hansson, I.; Morrell, J.M. Antimicrobial Resistance in Equine Reproduction. *Animals* **2021**, *11*.
- Troedsson, M.H.T.; Nielsen, J.M. Non-Antibiotic Treatment of Equine Endometritis. *Pferdeheilkunde* **2018**, *34*, 17–22, doi:10.21836/PEM20180103.
- Buczowska, J.; Kozdrowski, R.; Sikora, M.; Dziecioł, M.; Matusz, A. Non-Traditional Treatments for Endometritis in Mares. *Bulg J Vet Med* **2015**, *18*, 285–293.
- Rex, J.H.; Fernandez Lynch, H.; Cohen, I.G.; Darrow, J.J.; Outtersen, K. Designing Development Programs for Non-Traditional Antibacterial Agents. *Nat Commun* **2019**, *10*.
- Hays, J.P.; Ruiz-Alvarez, M.J.; Roson-Calero, N.; Amin, R.; Murugaiyan, J.; van Dongen, M.B.M. Perspectives on the Ethics of Antibiotic Overuse and on the Implementation of (New) Antibiotics. *Infect Dis Ther* **2022**, *11*, 1315–1326.
- Ferris, R.A.; McCue, P.M.; Borlee, G.I.; Loncar, K.D.; Henet, M.L.; Borlee, B.R. In Vitro Efficacy of Nonantibiotic Treatments on Biofilm Disruption of Gram-Negative Pathogens and an in Vivo Model of Infectious Endometritis Utilizing Isolates from the Equine Uterus. *J Clin Microbiol* **2016**, *54*, 631–639, doi:10.1128/JCM.02861-15.
- Scoggin, C.F. Endometritis: Nontraditional Therapies. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* **2016**, *32*, 499–511, doi:10.1016/j.cveq.2016.08.002.
- Buczowska, J.; Kozdrowski, R.; Sikora, M.; Dziecioł, M.; Matusz, A. Non-Traditional Treatments for Endometritis in Mares. *Bulg J Vet Med* **2015**, *18*, 285–293.
- McCue, P.M.; Ferris, R.A. *Formulary and Protocols in Equine Reproduction*; 2016; ISBN 9780996526906.
- Smith, O.J.; Wicaksana, A.; Davidson, D.; Spratt, D.; Mosahebi, A. An Evaluation of the Bacteriostatic Effect of Platelet-Rich Plasma. *Int Wound J* **2021**, *18*, 448–456, doi:10.1111/iwj.13545.

16. Cieřlik-Bielecka, A.; Bold, T.; Ziółkowski, G.; Pierchała, M.; Królikowska, A.; Reichert, P. Antibacterial Activity of Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma: An in Vitro Study. *Biomed Res Int* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/9471723.
17. Drago, L.; Bortolin, M.; Vassena, C.; Taschieri, S.; del Fabbro, M. Antimicrobial Activity of Pure Platelet-Rich Plasma against Microorganisms Isolated from Oral Cavity. *BMC Microbiol* **2013**, *13*, doi:10.1186/1471-2180-13-47.
18. Marini, M.G.; Perrini, C.; Esposti, P.; Corradetti, B.; Bizzaro, D.; Riccaboni, P.; Fantinato, E.; Urbani, G.; Gelati, G.; Cremonesi, F.; et al. Effects of Platelet-Rich Plasma in a Model of Bovine Endometrial Inflammation in Vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2016**, *14*, doi:10.1186/s12958-016-0195-4.
19. Jasmine, S.; A., T.; Janarthanan, K.; Krishnamoorthy, R.; Alshatwi, A.A. Antimicrobial and Antibiofilm Potential of Injectable Platelet Rich Fibrin—a Second-Generation Platelet Concentrate—against Biofilm Producing Oral Staphylococcus Isolates. *Saudi J Biol Sci* **2020**, *27*, 41–46, doi:10.1016/j.sjbs.2019.04.012.
20. Segabinazzi, L.G.T.M.; Canisso, I.F.; Podico, G.; Cunha, L.L.; Novello, G.; Rosser, M.F.; Loux, S.C.; Lima, F.S.; Alvarenga, M.A. Intrauterine Blood Plasma Platelet-Therapy Mitigates Persistent Breeding-Induced Endometritis, Reduces Uterine Infections, and Improves Embryo Recovery in Mares. *Antibiotics* **2021**, *10*, doi:10.3390/antibiotics10050490.
21. Segabinazzi, L.G.T.M.; Canisso, I.F.; Podico, G.; Cunha, L.L.; Novello, G.; Rosser, M.F.; Loux, S.C.; Lima, F.S.; Alvarenga, M.A. Intrauterine Blood Plasma Platelet-Therapy Mitigates Persistent Breeding-Induced Endometritis, Reduces Uterine Infections, and Improves Embryo Recovery in Mares. *Antibiotics* **2021**, *10*, doi:10.3390/antibiotics10050490.
22. Pham, T.A.V.; Tran, T.T.P.; Luong, N.T.M. Antimicrobial Effect of Platelet-Rich Plasma against Porphyromonas Gingivalis. *Int J Dent* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/7329103.
23. El-Sharkawy, H.; Kantarci, A.; Deady, J.; Hasturk, H.; Liu, H.; Alshahat, M.; van Dyke, T.E. Platelet-Rich Plasma: Growth Factors and Pro- and Anti-Inflammatory Properties. *J Periodontol* **2007**, *78*, 661–669, doi:10.1902/jop.2007.060302.
24. Yarza, P.; Yilmaz, P.; Pruesse, E.; Glöckner, F.O.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H.; Whitman, W.B.; Euzéby, J.; Amann, R.; Rosselló-Móra, R. Uniting the Classification of Cultured and Uncultured Bacteria and Archaea Using 16S rRNA Gene Sequences. *Nat Rev Microbiol* **2014**, *12*, 635–645, doi:10.1038/nrmicro3330.
25. Canisso, I.F.; Stewart, J.; Coutinho da Silva, M.A. Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* **2016**, *32*, 465–480.
26. 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* **2014**, *82*, 36–42, doi:10.1016/j.theriogenology.2014.02.015.
27. Strejcek, M.; Smrhova, T.; Junkova, P.; Uhlik, O. Whole-Cell MALDI-TOF MS versus 16S rRNA Gene Analysis for Identification and Dereplication of Recurrent Bacterial Isolates. *Front Microbiol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.01294.
28. Timperio, A.M.; Gorrasi, S.; Zolla, L.; Fenice, M. Evaluation of MALDI-TOF Mass Spectrometry and MALDI BioTyper in Comparison to 16S rDNA Sequencing for the Identification of Bacteria Isolated from Arctic Sea Water. *PLoS One* **2017**, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0181860.
29. Lisboa, F.P.; Silvestre, W.P.; Castro, J.O.; Martins, G. V.; Segabinazzi, L.G.T.M.; Pauletti, G.F.; Dell'Aqua, J.A. In Vitro Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils Against Endometritis-Causing Microorganisms in Mares. *J Equine Vet Sci* **2022**, *110*, doi:10.1016/j.jevs.2021.103840.

30. Scoggin, C.F. Endometritis: Nontraditional Therapies. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* 2016, 32, 499–511. 596 597
31. Katila, T.; Ferreira-Dias, G. Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals* 2022, 12. 598 599
32. Ferris, R.A.; McCue, P.M.; Borlee, G.I.; Loncar, K.D.; Hennes, M.L.; Borlee, B.R. In Vitro Efficacy of Nonantibiotic Treatments on Biofilm Disruption of Gram-Negative Pathogens and an in Vivo Model of Infectious Endometritis Utilizing Isolates from the Equine Uterus. *J Clin Microbiol* 2016, 54, 631–639, doi:10.1128/JCM.02861-15. 600 601 602 603
33. Loncar, K.D.; Ferris, R.A.; McCue, P.M.; Borlee, G.I.; Hennes, M.L.; Borlee, B.R. In Vitro Biofilm Disruption and Bacterial Killing Using Nonantibiotic Compounds Against Gram-Negative Equine Uterine Pathogens. *J Equine Vet Sci* 2017, 53, 94–99, doi:10.1016/j.jevs.2017.02.003. 604 605 606
34. Morris, L.H.; McCue, P.M.; Aurich, C. Equine Endometritis: A Review of Challenges and New Approaches. 2020, doi:10.1530/REP. 607 608
35. Lorian, V. Differences between In Vitro and In Vivo Studies. *Letter to the Editor* 1988, 32, 1600–1601. 609
36. Mah, T.-F.C.; O’toole, G.A. Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *Trends Microbiol* 2001, 9, 34. 610 611
37. Berlanga, M.; Guerrero, R. Living Together in Biofilms: The Microbial Cell Factory and Its Biotechnological Implications. *Microb Cell Fact* 2016, 15. 612 613
38. Wood, D.C.; Wood, J. Pharmacologic and Biochemical Considerations of Dimethyl Sulfoxide. *Annals New York Academy of Science* 1975. 614 615
39. Tunçer, S.; Gurbanov, R.; Sheraj, I.; Solel, E.; Esenturk, O.; Banerjee, S. Low Dose Dimethyl Sulfoxide Driven Gross Molecular Changes Have the Potential to Interfere with Various Cellular Processes. *Sci Rep* 2018, 8, doi:10.1038/s41598-018-33234-z. 616 617 618
40. Pottz, G.E.; Rampey, J.H.; Benjamin, F. The Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Antibiotic Sensitivity of a Group of Medically Important Microorganisms: Preliminary Report. *Annals New York Academy of Sciences* 1967, 261–272. 619 620 621
41. Rosol, T.; Threlfall, W.R. Histopathologic Effects of Dimethyl Sulfoxide on Equine Endometrium. *Article in American Journal of Veterinary Research* 1988. 622 623
42. Ley, W.B.; Bowen, J.M.; Sponenberg, D.P.; Lessard, P.N. Dimethyl Sulfoxide Intrauterine Therapy in the Mare: Effects upon Endometrial Histological Features and Biopsy Classification. *Theriogenology* 1989, 32. 624 625
43. Buczkowska, J.; Kozdrowski, R.; Sikora, M.; Dziecioł, M.; Matusz, A. Non-Traditional Treatments for Endometritis in Mares. *Bulg J Vet Med* 2015, 18, 285–293. 626 627
44. Barreto, R.; Barrois, B.; Lambert, J.; Malhotra-Kumar, S.; Santos-Fernandes, V.; Monstrey, S. Addressing the Challenges in Antisepsis: Focus on Povidone Iodine. *Int J Antimicrob Agents* 2020, 56. 628 629
45. Tsuda, S.; Soutome, S.; Hayashida, S.; Funahara, M.; Yanamoto, S.; Umeda, M. Topical Povidone Iodine Inhibits Bacterial Growth in the Oral Cavity of Patients on Mechanical Ventilation: A Randomized Controlled Study. *BMC Oral Health* 2020, 20, doi:10.1186/s12903-020-1043-7. 630 631 632
46. NCCLS Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 2019. 633 634
47. Lowe, D.O.; Knowles, S.R.; Weber, E.A.; Railton, C.J.; Shear, N.H. Povidone-Iodine-Induced Burn: Case Report and Review of the Literature. *Pharmacotherapy* 2006, 26, 1641–1645, doi:10.1592/phco.26.11.1641. 635 636

48. Mahal, J.S.; Honparkhe, M.; Kumar, A.; Singh, P. Efficacy of Intrauterine Hydrogen Peroxide and Povidone Iodine Administration to Treat Endometritic Mares. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **2020**, *9*, 2427–2431, doi:10.20546/ijcmas.2020.903.277. 637
49. Godke, R.; Archpald, L.; Titkemeyer, C.; Thdmpson, D. A Histological Study of the Effect of Saline and Povidone-Iodine Infusions on the Equine Endometrium. *Theriogenology* **1992**, *37*, 1311–1325. 638
50. Ávila, A.C.A.; Diniz, N.C.; Serpa, R.T.; Chaves, M.M.B. de C.; Viu, M.A. de O.; de Oliveira, R.A. Effectiveness of Ozone Therapy in The Treatment of Endometritis in Mares. *J Equine Vet Sci* **2022**, *112*, doi:10.1016/j.jevs.2022.103900. 639
51. Silva, F.F.A.; do Nascimento, E.M.; de Paula, L.A.O.; Sandri, D.; Pagliosa, G.M.; Guirro, E.C.B. do P.; Lopes, M.D.C.S. Use of Ozone Therapy to Control Chronic Pain in Equine Laminitis. Case Report. *Journal of Ozone Therapy* **2021**, *5*, 20, doi:10.7203/jo3t.5.6.2021.18959. 640
52. Kohne, M.; Hofbauer, L.; Bottcher, D.; Tonissen, A.; Hegger, A.; Gorgens, A.; Ulrich, R.; Sieme, H. Comparison of Systemic Trimethoprim-Sulfadimethoxine Treatment and Intrauterine Ozone Application as Possible Therapies for Bacterial Endometritis in Equine Practice. *Front Vet Sci* **2023**. 641
53. Mazzuchini, M.P.; Garrido, L.; Segabinazzi, T.M.; Tongu, E.A.; Tiemi, C.; Okada, C.; Guilherme, J.; Joaquim, F.; Alvarenga, M.A. SAFETY OF UTERINE LAVAGE WITH OZONATED SALINE IN MARES (*Segurança Da Lavagem Uterina Com Solução Salina Ozonizada Em Éguas*); 2022; 642
54. Elvis, A.M.; Ekta, J.S. Ozone Therapy: A Clinical Review. *J Nat Sci Biol Med* 2011, *2*, 66–70. 643
55. Li, H.; Li, B. PRP as a New Approach to Prevent Infection: Preparation and in Vitro Antimicrobial Properties of PRP. *J Vis Exp* **2013**, doi:10.3791/50351. 644
56. Vanni, I. Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades Dos Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas Pela Técnica de Lisado Plaquetário, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”: Botucatu, 2016. 645
57. Eppley, B.L.; Woodell, J.E.; Higgins, J. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg* **2004**, *114*, 1502–1508, doi:10.1097/01.PRS.0000138251.07040.51. 646
58. Bielecki, T.M.; Gazdzik, T.S.; Arendt, J.; Szczepanski, T.; Król, W.; Wielkoszynski, T.; Surgeon, O. Antibacterial Effect of Autologous Platelet Gel Enriched with Growth Factors and Other Active Substances AN IN VITRO STUDY., doi:10.1302/0301-620X.89B3. 647
59. Canisso, I.F.; Stewart, J.; Coutinho da Silva, M.A. Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **2016**, *32*, 465–480, doi:10.1016/j.cveq.2016.08.004. 648
60. Ferris, R.A. Endometritis: Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* 2016, *32*, 481–498. 649
61. Ravaioli, V.; Raffini, E.; Tamburini, M.; Galletti, G.; Frasnelli, M. Infectious Endometritis in Mares: Microbiological Findings in Field Samples. *J Equine Vet Sci* **2022**, *112*, 103913, doi:10.1016/j.jevs.2022.103913. 650
62. Canisso, I.F.; Segabinazzi, L.G.T.M.; Fedorka, C.E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares — A Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. **2020**, *21*, 1432. 651
63. Bizzini, A.; Durussel, C.; Bille, J.; Greub, G.; Prodhom, G. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, *48*, 1549–1554. 652

-
64. Segabinazzi, L.G.T.M.; Podico, G.; Rosser, M.F.; Nanjappa, S.G.; Alvarenga, M.A.; Canisso, I.F. Three 679
Manual Noncommercial Methods to Prepare Equine Platelet-Rich Plasma. *Animals* **2021**, *11*, 680
doi:10.3390/ani11061478. 681
682

6. Supplementary Materials:

Table S1. – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Staphylococcus* sp.

	<i>Staphylococcus</i> sp.				
	H ₂ O ₂	LRS	O ₃	Iodine	DMSO
1:2	98 ^{Aa}	23 ^{Ab}	3 ^{Ab}	67 ^{Ab}	35 ^{Ab}
1:4	100 ^{Ba}	8 ^{Bb}	8 ^{Bb}	63 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:8	100 ^{Ba}	0 ^{Bb}	1 ^{Bb}	22 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:16	100 ^{Ba}	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}	0 ^B	0 ^{Bb}
1:32	100 ^{Ba}	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}	28 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:64	100 ^{Ba}	4 ^{Bb}	9 ^{Bb}	6 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:128	98 ^{Ba}	0 ^{Bb}	13 ^{Bb}	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}
C+	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B

Superscripts represent differences between treatments at the same dilution (^{ab}) and for each treatment in each dilution (^{A,B}). (H₂O₂) Hydrogen Peroxide; (LRS) Lactated Ringer; (O₃) Ozonated Lactated Ringer; (DMSO) Dimethyl Sulfoxide.

Table S2 – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Escherichia* sp.

	<i>Escherichia</i> sp.				
	H ₂ O ₂	LRS	O ₃	Iodine	DMSO
1:2	99 ^{Aa}	44 ^{Aab}	37 ^{Aab}	53 ^{Ab}	62 ^{Ab}
1:4	99 ^{Ba}	26 ^{Bab}	39 ^{Bab}	17 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:8	99 ^{Ba}	21 ^{Bab}	3 ^{Bab}	46 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:16	98 ^{Ba}	20 ^{Bab}	38 ^{Bab}	11 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:32	97 ^{Ba}	39 ^{Ba}	47 ^{Bab}	13 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:64	20 ^{Ba}	24 ^{Bab}	21 ^{Bab}	1 ^{Bb}	0 ^{Bb}
1:128	7 ^{Ba}	44 ^{Bab}	36 ^{Bab}	0 ^{Bb}	0 ^{Bb}
C+	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B	0 ^B

Superscripts represent differences between treatments at the same dilution (^{a,b}) and for each treatment in each dilution (^{A,B}). (H₂O₂) Hydrogen Peroxide; (LRS) Lactated Ringer; (O₃) Ozonated Lactated Ringer; (DMSO) Dimethyl Sulfoxide.

Table S3. – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Pseudomonas* sp..

	<i>Pseudomonas</i> sp.				
	H ₂ O ₂	LRS	O ₃	Iodine	DMSO
1:2	99	14	0	1	95
1:4	98	0	0	0	8
1:8	97	11	0	0	0
1:16	97	17	7	0	0
1:32	1	21	0	0	0
1:64	0	4	7	0	0
1:128	0	0	3	0	0
C+	0	0	0	0	0

(H₂O₂) Hydrogen Peroxide; (LRS) Lactated Ringer; (O₃) Ozonated Lactated Ringer; (DMSO) Dimethyl Sulfoxide.

Table S4. – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Klebsiella* sp.

	<i>Klebsiella</i> sp.				
	H ₂ O ₂	LRS	O ₃	Iodine	DMSO
1:2	100 ^a	34 ^b	32 ^b	0 ^b	15 ^b
1:4	100 ^a	9 ^b	15 ^b	0 ^b	10 ^b
1:8	100 ^a	0 ^b	2 ^b	0 ^b	0 ^b
1:16	100 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
1:32	100 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
1:64	100 ^a	19 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
1:128	99 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
C+	0	0	0	0	0

Superscripts represent differences between treatments at the same dilution (a,b). (H₂O₂) Hydrogen Peroxide; (LRS) Lactated Ringer; (O₃).Ozonated Lactated Ringer; (DMSO) Dimethyl Sulfoxide.

Table S5. – Percentage of inhibition of non-biological alternative therapies against *Candida* sp.

	<i>Candida</i> sp.				
	H ₂ O ₂	LRS	O ₃	Iodine	DMSO
1:2	94 ^a	2 ^b	22 ^b	63 ^b	72 ^b
1:4	100 ^a	5 ^b	22 ^b	43 ^b	6 ^b
1:8	100 ^a	6 ^b	30 ^b	6 ^b	0 ^b
1:16	99 ^a	7 ^b	32 ^b	0 ^b	0 ^b
1:32	99 ^a	0 ^b	28 ^b	0 ^b	1 ^b
1:64	99 ^a	0 ^b	33 ^b	0 ^b	0 ^b
1:128	99 ^a	0 ^b	20 ^b	0 ^b	0 ^b
C+	0	0	0	0	0

Superscripts represent differences between treatments at the same dilution (a,b). (H₂O₂) Hydrogen Peroxide; (LRS) Lactated Ringer; (O₃).Ozonated Lactated Ringer; (DMSO) Dimethyl Sulfoxide.

Table S6- Products and mechanisms of action against microorganisms.

Product	Mechanisms of action
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Postulated to reduce endometrial inflammation by scavenging free radical [35].
Lactated Ringer's solution (LRS)	Promotes mechanic uterine clearance, removing ROS, cellular debris and microorganisms [4]
Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	Oxidizes lipids, proteins and nucleic acids and inhibit carbohydrate and lactic acid production leading to cell death [55] [56].
Ozonated LRS (O ₃)	Ozone molecule bind to microorganisms' cell leading to complete oxidation and cellular death [42] [57].
Povidone-iodine (Iodine)	Penetrate in microorganisms and oxidizes the cell leading to death, and biofilm disruption [41][58], [59].
Platelet-rich plasma (PRP)	Platelets forms microaggregates around the bacteria, secreting antimicrobial peptides that promotes bacteriostatic effect and can result in their death [16][17][51][60]

Table S7. Results of Kirby-Bauer antibiotic sensitivity test for common drugs used in clinical practice.

Microorganisms	AMI	AMP	AMC	CIP	CPM	CRO	CTF	DOX	ENO	GEN	SUT	PEN
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	S	I	I	R	R	R	S	R	S	R

Abbreviations: AMI, amikacin; AMC, amoxicillin and clavulanate; AMP, ampicillin; COM, cefepime; CTF, ceftiofur; CIP, ciprofloxacin; DOX, doxycycline; ENO, enrofloxacin; GEN, gentamicin; PEN, penicillin G; SUT, sulfametoazol+trimetoprima; R, Resistant; I, Intermediary; S, Susceptible.



Figure S1- *Staphylococcus* phylogenetic tree

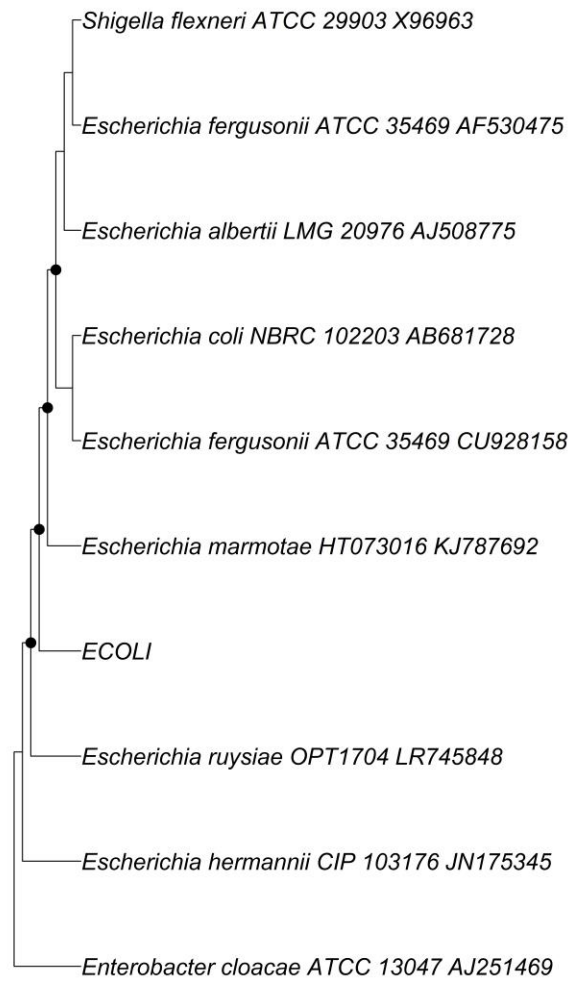


Figure S2. *Escherichia* sp. phylogenetic tree.

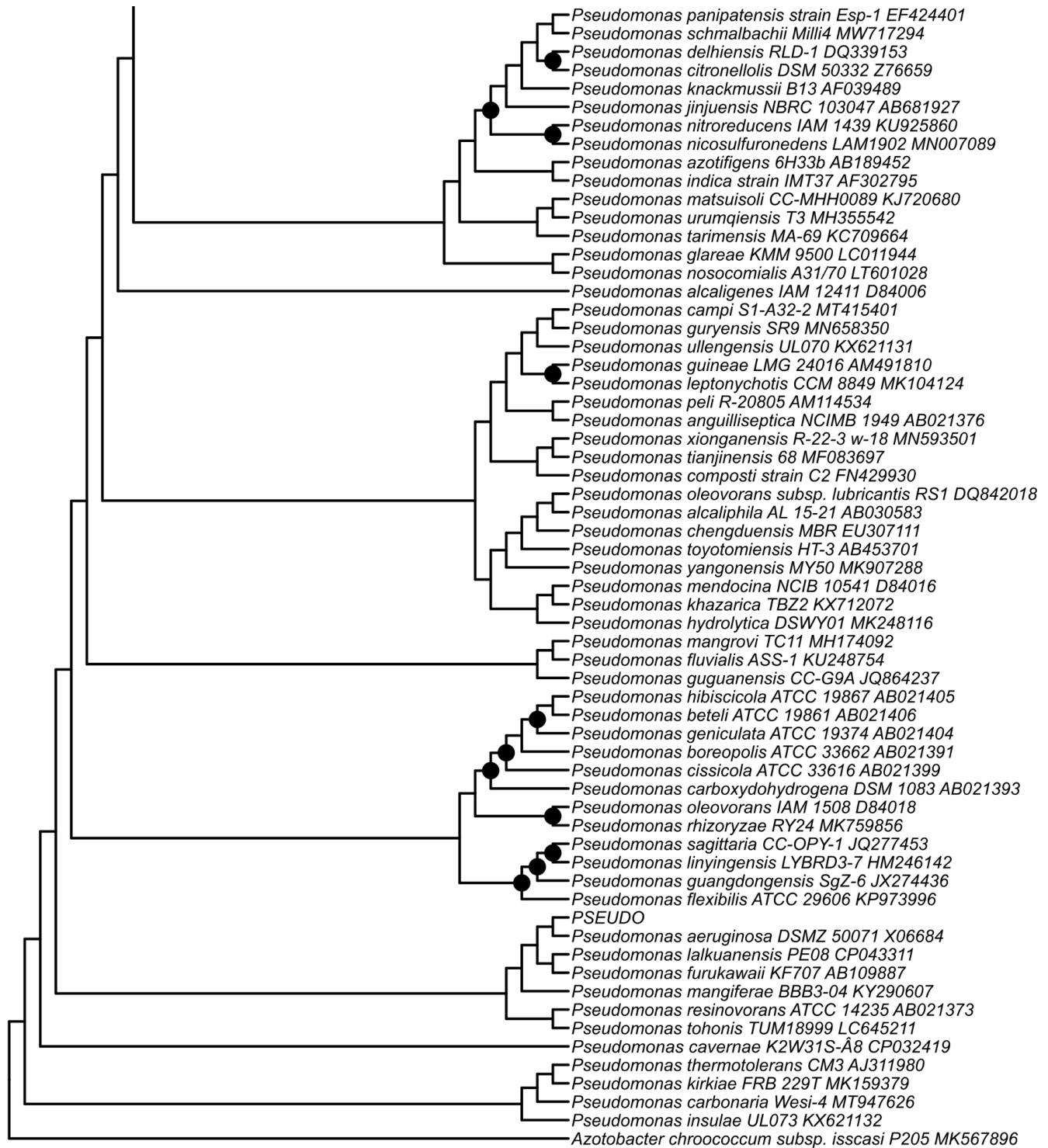


Figure S3. - *Pseudomonas* sp. phylogenetic tree.

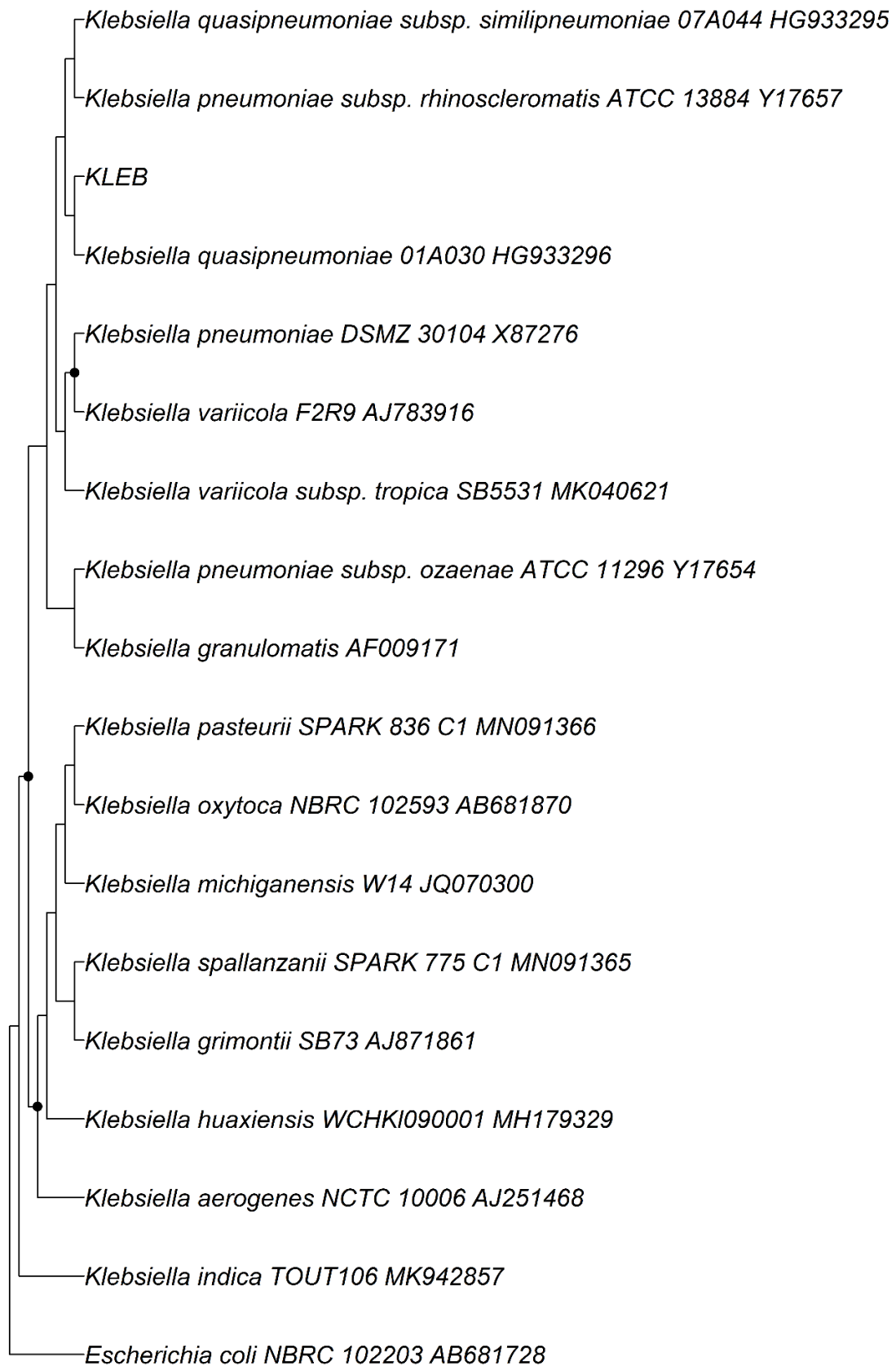


Figure S4. *Klebsiella* sp. phylogenetic tree.