



**NATHÁLIA ALVES**

**INSUFLAÇÃO UTERINA COM OZÔNIO EM ÉGUAS COM ENDOMETRITE  
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI***

**LAVRAS – MG**

**2022**

**NATHÁLIA ALVES**

**INSUFLAÇÃO UTERINA COM OZÔNIO EM ÉGUAS COM  
ENDOMETRITE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE  
*ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, área de  
concentração Reprodução Animal,  
para a obtenção do título de Mestre.

Prof. José Camisão de Souza, Ph.D.

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Alves, Nathália.

Insuflação uterina com ozônio em éguas com endometrite induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli* / Nathália Alves. - 2022.

58 p. : il.

Orientador(a): José Camisão de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Ozonioterapia. 2. Reprodução. 3. Tratamento. I. Souza, José Camisão de. II. Título.

**NATHÁLIA ALVES**

**INSUFLAÇÃO UTERINA COM OZÔNIO EM ÉGUAS COM  
ENDOMETRITE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO DE  
*ESCHERICHIA COLI***

**UTERINE INFLATION WITH OZONE IN MARES WITH  
*ESCHERICHIA COLI* LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED  
ENDOMETRITIS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, área de  
concentração Reprodução Animal,  
para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 14 de fevereiro de 2022.

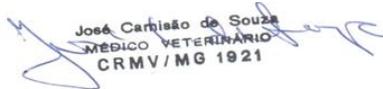
Ph. Dr. José Camisão de Souza UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dra. Renata Maculan IF MACHADO

Prof. José Camisão, de Souza, Ph.D.

Orientador



José Camisão de Souza  
MÉDICO VETERINÁRIO  
CRMV/MG 1921

---

**LAVRAS – MG**

**2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por me proporcionarem a realização desse sonho.

Aos meus pais, José Alexandre e Edilene, pelo apoio, amor, dedicação, incentivo e por sempre acreditarem em mim. A vocês dedico essa conquista. Obrigada por toda instrução passada e por me fazerem uma pessoa melhor a cada dia. Grata por tanto amor e carinho e por sempre se fazerem presente na vida dos meus filhos.

Ao meu irmão, José Alexandre Alves Júnior e minha cunhada Daiani Evangelista, pela amizade, companheirismo, apoio e torcida. Aos meus avós por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu noivo, Diego, pelo companheirismo e por ter embarcado nesse sonho comigo, sempre me lembrando que um dia todo meu esforço valeria à pena e que eu não me arrependeria de fazê-lo para chegar até aqui. Aos meus filhos Luís Felipe e Guilherme por me fazerem sentir vontade de lutar sempre por um futuro melhor.

Ao professor Camisão, pelo privilégio de ser sua orientada ao longo da minha formação, por todos os ensinamentos, confiança, amizade e por ser um exemplo para mim.

Aos professores Flademir Wouters do Setor de Patologia e Geraldo Márcio do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA pela dedicação na confecção das lâminas para histologia, e materias para cultura, além do auxílio na interpretação dos resultados.

Ao Gere por todos momentos de aprendizado e conhecimentos adquiridos.

A Luciana França por toda ajuda e apoio que sempre me deu nesses anos de amizade, principalmente pelo auxílio, confiança, companheirismo para realização deste trabalho. Lú obrigada por tudo sempre, você é mais do que especial na minha vida.

A Giovanna por todo apoio, paciência, confiança e por estar presente em mais uma batalha comigo.

As minhas amigas Renata, Catarina, Natalia e Fernanda por toda ajuda nos momentos de desespero e dificuldade, assim como nos momentos de comemoração. Ao Marcelo pelas correções e explicações sobre o assunto.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)”.  
O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)”.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo, o meu muito obrigado.

Gratidão a todos!

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar se aplicações de insuflação uterina com ozônio, em éguas induzidas à endometrite com o uso de Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (*E. coli*), é capaz de reduzir o número de células inflamatórias no útero. Foram utilizadas 20 éguas, submetidas a exames citológicos, biópsia e cultura, alocadas aleatoriamente em três tratamentos: Tratamento Ozônio1 (TO1), consistiu na aplicação do gás diretamente no útero, através de insuflação por 6 minutos, na concentração de 35 mg/mL, com fluxo de 0,25 L/mm e sendo disponibilizados 1,5 litros de gás para cada animal; Tratamento Ozônio2 (TO2), foi mesmo procedimento do tratamento 1, porém, realizado em dois dias consecutivos; e Tratamento 3 Controle negativo (TCN), em que os animais não receberam LPS, mas somente uma aplicação de ozônio, como no tratamento 1. Foram realizadas duas avaliações, a primeira comparando os tratamentos e a segunda comparando as citologias dentro de cada um dos tratamentos. Na primeira análise (entre tratamentos) as 4 primeiras citologias tiveram valores semelhantes, porém na citologia 5 os valores de polimorfonucleares (PMNs) foram diferentes ( $P=0.01$ ), sendo TO1 ( $0.21\pm 2.7$ ) e TO2 ( $10.6\pm 2.9$ ). Na segunda análise o número de PMNs foi menor ( $P = 0.01$ ) na citologia 1 do TO1 ( $0.77\pm 2.5$ ), comparado com as citologias 2, 3 e 4 ( $8.86\pm 2.5$ ,  $7.58\pm 2.5$  e  $11.26\pm 2.5$ , respectivamente, e na citologia 5 no número de PMN foi semelhante a citologia 1 ( $P = 0.01$ )  $0.21\pm 2.5$  demonstrando o possível efeito do ozônio. No TO 2, os resultados para PMNs também diferiram ( $P<0.001$ ), sendo que para as citologias 1,2,3,4,5 e 6 os valores foram  $0.36\pm 3.12$ ,  $10.90\pm 3.12$ ,  $3.30\pm 3.12$ ,  $16.86\pm 3.12$ ,  $10.57\pm 3.12$  e  $0.07\pm 3.12$ , respectivamente. E no TCN os valores de PMNs foram diferentes ( $P=0.002$ ), sendo que nas citologias 1, 2 e 3 a média de PMNs foi de  $0.82\pm 1.3$ ,  $10.38\pm 1.3$ ,  $0.18\pm 1.3$  respectivamente. Amostras de biópsia e cultura foram coletadas no D0 e D4, as análises histopatológicas não foram diferentes entre os grupos avaliados. Em relação a cultura, no TO1, 12.5% dos animais que possuíam bactérias no cultivo 1 se tornaram negativos para o cultivo 2 (após a aplicação do gás), e no TO2 28.6%. Os resultados sugerem que apenas uma aplicação de O<sub>3</sub> suficiente para diminuir a quantidade de PMNs nas amostras citológicas, sendo benéfico para o tratamento de endometrites, e que, duas aplicações foram mais eficientes em relação à diminuição da quantidade de microrganismos na cultura.

**Palavras-chave: Ozonioterapia, Reprodução, Tratamento, Útero.**

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate whether applications of uterine insufflation with ozone in mares induced to endometritis applying lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (*E. coli*) can reduce the number of inflammatory cells in the uterus after treatment. Twenty mares were submitted to cytological tests, biopsy, culture, and blood count, randomly allocated in three treatments: Ozone Treatment1 (TO1), which consisted of applying the gas directly to the uterus, through insufflation for 6 minutes, at a concentration of 35 mg /mL, 0.25 L/mm of flow and 1.5 liters of gas for each animal; Ozone Treatment2 (TO2), which consisted of the same procedure as treatment 1, however, performed on two consecutive days; and Treatment 3 Negative control (TCN), in which the animals did not receive LPS, but only one application of ozone, as described in treatment 1. Two evaluations were performed, the first comparing the treatments and the second comparing the cytology within each of the treatments. In the first analysis (between treatments) the first 4 cytologies had similar values, however in cytology 5 the values of polymorphonuclear cells (PMNs) were different ( $P=0.01$ ), being TO1 ( $0.21\pm 2.7$ ) and TO2 ( $10.6\pm 2.9$ ). When the analyzes were comparing the cytology performed in each treatment, the PMN values were different in treatment 1 ( $P = 0.01$ ), in treatment 2 ( $P<0.001$ ) and in TCN ( $P=0.002$ ). Biopsy and culture samples were collected on D0 and D4, the histopathological analyzes were not different between the groups evaluated, therefore, the procedures performed did not cause any apparent damage to the endometrium. In relation to culture, TO1, 12.5% of the animals that had bacteria in culture 1 became negative in culture 2, in TO2 28.6% the results suggest that only one application of O<sub>3</sub> was necessary to reduce the amount of PMNs in the cytological samples, being beneficial for the treatment of endometritis, and that two applications were more efficient in terms of reducing the amount of microorganisms in the culture.

Keywords: Ozone therapy, Reproduction, Treatment, Uterus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A - folículo dominante 35 mm de diâmetro / B - Edema uterino .....	28
Figura 2: A – LPS de <i>E.coli</i> / B – inoculação do LPS com uso de pipeta de IA.....	28
Figura 3: A – Coleta para cultura realizada através do lavado de baixo volume / B – material sendo colocado no meio de Stuart .....	29
Figura 4: Coleta de material para citologia endometrial .....	30
Figura 5: Confecção da lâmina para exame de citologia endometrial.....	30
Figura 6: Coleta e armazenamento de biópsia uterina.....	31
Figura 7: Infusão intrauterina de ozônio.....	31
Figura 8: Efeito do tratamento com insuflação uterina de ozônio na contagem de células PMNs de éguas induzidas à endometrite com LPS de <i>E.coli</i> .....	37
Figura 9: A – Células endometriais normais / B - Presença de PMNs em citologia endometrial. Grau moderado de acometimento, aumento de 1000X e grau intenso (C) aumento de 1000X.....	38
Figura 10: A - Corte histológico do endométrio normal antes e depois (B) dos procedimentos experimentais .....	39
Figura 11: Placa de cultura endometrial com crescimento bacteriano .....	39
Figura 12: Lâminas de cultura endometrial .....	40

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Comparação das citologias em cada tratamento realizado em égua submetidas à endometrite induzida por LPS .....	38
Tabela 2: Efeito do tratamento no cultivo bacteriano oriundo de LBV (P=0.19) .....	40

## LISTA DE SIGLAS

D	Dia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IA	Inseminação artificial
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina- 1
LBV	Lavado de baixo volume
NO	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>3</sub>	Ozônio
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PFA	Proteína de fase aguda
PMNs	Polimorfonucleares
RFA	Resposta de fase aguda

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2.	OBJETIVOS .....	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
3.1	Endometrite .....	13
3.1.1	Métodos de Diagnóstico para endometrite.....	14
3.1.2	Tratamentos para endometrite .....	17
3.2	Defesa uterina .....	20
3.3	Lipopolissacarídeo bacteriano .....	22
3.4	Ozonioterapia .....	23
3.4.1	Ozônio como antioxidante .....	24
3.4.2	Resposta Imunológica do Ozônio .....	25
3.4.3	Ação do Ozônio nos patógenos .....	25
4.	HIPÓTESES .....	26
5.	MATERIAL E MÉTODOS .....	27
5.1	Animais.....	27
5.2	Procedimentos Experimentais.....	27
5.3	Tratamentos .....	31
5.3.1	Tratamento Ozônio 1 (TO1) .....	32
5.3.2	Tratamento Ozônio 2 (TO2) .....	32
5.3.3	Tratamento controle negativo (TCN) .....	32
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
8.	CONCLUSÃO .....	41
9.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

A endometrite é definida como a inflamação aguda ou crônica do endométrio. Essa patologia é apontada como causa de perdas econômicas na criação de equinos, tendo em vista o crescente interesse por animais de qualidade genética superior e, conseqüentemente, na geração de seus descendentes.

São várias as afecções que podem acometer a saúde dos equinos, sendo a endometrite a mais relevante na reprodução, se destacando como causa de subfertilidade e infertilidade em éguas. Essa enfermidade pode ter diferentes causas, podendo ser de origem bacteriana, viral, fúngica ou pós-cobertura (ocasionada pela presença dos espermatozoides e algumas sujidades oriundas da monta/ IA). Em condições normais, após a inseminação ou cobertura, ocorre uma reação inflamatória que deve ser eliminada em até 96 horas. A presença de líquido ou agentes infecciosos no trato reprodutivo da fêmea pode comprometer o transporte dos espermatozoides e, conseqüentemente, a fertilização e sobrevivência do embrião, tendo em vista que no 5º ou 6º dia após a fertilização o embrião chegará ao lúmen uterino.

Sendo assim, existem vários tratamentos utilizados com a finalidade de sanar as endometrites, como antibioticoterapias, ecbólicos, anti-inflamatórios e lavagem uterina utilizando agentes como soro, ringer com lactato, soluções iodadas e substâncias irritantes. Apesar desses tratamentos na maioria das vezes apresentarem efeito desejado, surge a preocupação com o uso indiscriminado de antibióticos, que, pode alterar a resistência de bactérias que causam doenças e tornar o medicamento ineficaz no seu combate. Além de dificultar o tratamento, esse fato pode afetar bactérias funcionais para o organismo. Aliado a isso existe a produção de poluentes para o meio ambiente. Esses fatores tornam necessário o estudo de novas modalidades de tratamentos alternativos. Neste sentido, a ozonioterapia vem se destacando como uma alternativa com muitas vantagens.

O ozônio surge como uma ferramenta rápida e funcional para o tratamento das endometrites, tendo em vista sua fácil utilização e ação microbicida e fungicida. Seu potencial oxidante é capaz de lesionar a membrana do microrganismo, tornando-o inativo em um tempo relativamente menor, o que inviabiliza sua recuperação. Estudar melhor

seu efeito é de grande importância, dada a necessidade de implementação de tratamentos que sirvam como suporte para evitar que éguas acometidas se tornem um problema no plantel, causando diminuição nas taxas de prenhez nos programas de TE e manejos reprodutivos em geral.

## **2. OBJETIVOS**

Tendo em vista as propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias do ozônio, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito de insuflação uterina com ozônio em éguas induzidas à endometrite com o uso de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia Coli*.

## **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1 Endometrite**

A endometrite é descrita como a inflamação do endométrio causada por fungos ou bactérias, podendo se manifestar de forma aguda ou crônica e causar degenerações no ambiente uterino (LeBLANC e CAUSEY, 2009). A endometrite vem sendo apontada nos últimos 40 a 50 anos como a principal causadora de infertilidade em éguas. O emprego da ultrassonografia e a qualificação da mão de obra, tornou o diagnóstico desta patologia mais simples, inclusive na fase aguda, sendo possível observar o acúmulo de líquido no útero (TROEDSSON 1999; LIU & TROEDSSON 2008; LEBLANC 2010; TROEDSSON e WOODWAR2016; CANISSO et al., 2020).

O útero é responsável pela implantação e desenvolvimento embrionário. Quando o embrião encontra um ambiente inadequado com presença de líquido ou inflamação, não há o desenvolvimento adequado e sua sobrevivência pode ser comprometida. Como consequência, ocorre menor taxa de concepção e maior taxa de retorno ao estro após a cobertura (OVERBECK et al., 2011; RASMUSSEN et al., 2015).

Normalmente, após a realização da cobertura ou inseminação artificial, o organismo inicia mecanismos fisiológicos específicos para eliminar o excesso de espermatozoides e sujidades que foram inseridas no útero, para que assim o embrião encontre um ambiente favorável ao seu desenvolvimento. Neste momento, uma resposta inflamatória é desencadeada para a depuração uterina de forma fisiológica, chamada de endometrite pós-cobertura. Porém, animais que são susceptíveis a esta patologia não são

capazes de cessar este processo após 48h, o que pode resultar em uma inflamação de maior proporção, podendo levar até mesmo à fibrose do útero (CHRISTOFFERSEN e TROEDSSON, 2017; CANISSO et al., 2020).

As éguas de maior susceptibilidade às endometrites pós-cobertura (EPC) geralmente são aquelas que apresentam características como idade avançada, má conformação perineal e maior número de partos. Hughes e Loy (2006) compararam a idade da égua ao potencial de remoção bacteriana do útero, sendo que animais jovens foram capazes de eliminar até mesmo patógenos considerados com maior resistência à endometrite inseridos no útero de forma experimental (HUGHES e LOY 2006).

São vários os agentes causadores desta enfermidade, porém, as bactérias aeróbias estão associadas de forma mais evidente. Isto não significa que o grupo das anaeróbias não possa causar a patologia, mas ocorre com menor frequência (RIDDLE et al., 2007; LEBLANC et al., 2009). Em casos de endometrites, as bactérias isoladas com maior frequência foram *Streptococcus*, seguido de *Coliformes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (CANISSO et al., 2016; TROEDSSON et al., 2014; WALTER et al., 2012; LEBLANC et al., 2007; BELTAIRE et al., 2012). A ocorrência de *Staphylococcus equi*, subespécie *Zooepidemicus*, foi associada à endometrite aguda e a de *E. Coli* à endometrite crônica. (FRONTOSO et al., 2008; ALBIHN et al., 2003). É importante ressaltar que, em 25-60% das éguas que apresentam dificuldade em ficarem prenhes, já existe uma infecção bacteriana instalada (COLLINS et al., 1964; BAIN et al., 1996). Além desses agentes, fungos também podem ser responsáveis por acarretar a inflamação do endométrio. Porém, são citados com menor destaque quando comparados às bactérias, com prevalência de 1-5%.

Portanto, é relevante para os criadores que os animais não possuam esta patologia, pois as taxas de prenhez podem sofrer grande declínio prejudicando de forma significativa o desempenho da estação de monta. Por isso, estudos envolvendo as causas, diagnósticos e tratamentos são importantes para diminuir, de forma significativa a ocorrência de endometrites.

### **3.1.1 Métodos de Diagnóstico para endometrite**

É de grande valia que os animais recebam um diagnóstico precoce e eficaz da endometrite para que não ocorram perdas reprodutivas na estação de monta. É essencial

a obtenção de informações do histórico reprodutivo de cada animal, como idade, acúmulo de líquido intrauterino, perdas embrionárias de estações de monta anteriores, retorno ao estro, dificuldade de prenhez e descarga vulvar, associada à realização de exames como citologia, biópsia e cultura. Essas ferramentas auxiliam o diagnóstico precoce da endometrite aumentando as chances de sucesso no tratamento (NIELSEN et al., 2014).

### **3.1.1.1 Citologia uterina**

A avaliação das células endometriais é importante quando se procura diagnosticar a endometrite. Por isso, o exame de citologia busca caracterizar as células do epitélio endometrial em relação às células inflamatórias, além disso a presença de colônias bacterianas que são as principais causadoras da doença (FERRIS et al.; 2005).

Existem vários métodos de coleta para a realização da citologia. Dentre os mais comuns estão o cotonete com ponta de algodão simples ou com proteção dupla, o *cytobrush* (escova de nylon) e a lavagem uterina de baixo volume (LBV). A citologia coletada por meio do *cytobrush* é capaz de produzir amostras mais significativas do útero, por possuir cerdas mais penetrantes. Através do LBV é possível captar o líquido que percorreu por todo o órgão. O LBV e o *cytobrush* têm a capacidade de produzir amostras mais representativas quando comparadas aos cotonetes, sendo o método de *cytobrush* mais rápido e simples de ser executado do que o lavado (FERRIS et al., 2015; BOHN et al., 2014; COCCHIA et al., 2012).

Antes de realizar a coleta é necessário fazer a higienização da região perineal e, através da vagina, o coletor protegido por camisa sanitária é introduzido no cérvix, momento em que a camisa sanitária é rompida. O coletor é, então, direcionado para o lúmen uterino e a haste é exposta para entrar em contato com o endométrio. São realizados movimentos rotatórios para a obtenção do material. Em seguida, a haste é direcionada para dentro do tubo e o conjunto é retirado sem que ocorra a contaminação com células presentes na cérvix e vagina (KOZDROWSKI et al., 2015).

Após a coleta das amostras, a escova percorre a lâmina com movimentos rotatórios para depositar o material celular na mesma. Após a secagem, as lâminas são coradas utilizando kit próprio para, posteriormente, serem analisadas em microscópio de luz, no aumento de 400x ou 1000x (neste caso, com o uso de óleo de imersão). Existem vários métodos para avaliação das lâminas e fornecimento de um diagnóstico. A

porcentagem mínima de polimorfonucleares (PMNs) difere entre alguns estudos quanto à gravidade da infecção. É válido salientar que, durante o estro, é normal a presença de eventuais PMNs. Nesse período, a vascularização e o edema endometriais aumentam, e, é possível ocorrer a migração de células de defesa para o local, mesmo sem haver infecção. (AMORIM et al., 2016; COUTO e HUGHES, 1984; KOZDROWSKI et al., 2015).

Dois métodos de contagem celular são descritos na literatura. O primeiro deles avalia a quantidade de PMNs em comparação às células endometriais, sem considerar os campos analisados (COUTO e HUGUES, 1884; NIELSEN, 2005). O segundo avalia PMNs em cada campo (RIDDLE, 2007), sendo este o mais usado.

Foi demonstrado que amostras uterinas podem ser consideradas positivas quando apresentarem mais de 2% de PMN do total de células endometriais (OVERBECK et al., 2011). Outros autores consideram a classificação de < 5% normal; 5% a < 15% inflamação discreta;  $\geq 15\%$  a < 30% inflamação moderada e > 30% inflamação severa (BROOK et al., 1993).

### **3.1.1.2 Histologia endometrial**

A biópsia endometrial também pode ser um método diagnóstico para a endometrite. Porém, não é muito utilizada na rotina, pois tem menor praticidade na realização da coleta e o resultado tende a ser mais demorado (OVERBECK et al., 2011; CANISSO et al., 2016).

Com o auxílio de uma pinça de Shumacher para coleta de biópsia endometrial, uma fração do endométrio é coletada e acondicionada em solução de formol tamponado. No laboratório é feito um corte para histologia, que vai ser corado com hematoxilina-eosina. Sob microscopia ótica, analisa-se o grau de fibrose, presença de agentes infecciosos, inflamação e até mesmo má formação do endométrio (SNIDER, 2011).

Kenney e colaboradores propuseram um método de classificação das endometrites que separa o endométrio em relação à distribuição de suas glândulas e células inflamatórias sendo de I-III, dependendo dos achados (KENNEY et al., 1986). Por meio desse sistema é possível determinar certa tendência à endometrite. Essa classificação,

associada ao histórico clínico e reprodutivo do animal, podem ser utilizados para definição de fertilidade. (KENNEY, 1975; RICKETTS e ALONSO 1991).

As células do sistema imune, como os neutrófilos, estão presentes na circulação superficial. Portanto, quando encontrados no extrato compacto do endométrio, podem ser correlacionadas com inflamações (KENNEY, 1978).

O estudo realizado por Buczkowska e colaboradores (2014), mostrou que a citologia uterina associada à histopatologia tem maior poder de diagnóstico para endometrite. Os resultados apontaram alta correlação entre citologia positiva e endometrite. De maneira que a citologia positiva pode ser usada como diagnóstico, tendo em vista sua praticidade, rapidez dos resultados e custo mais acessível.

### **3.1.1.3 Cultura de lavado uterino**

Estudos demonstram que o lavado de baixo volume (LBV) é um teste confiável e com alta sensibilidade para diagnosticar endometrite bacteriana (CHRISTOFFERSEN et al., 2015; KATIL et al., 2016). O LBV é realizado através de uma sonda de silicone estéril inserida no útero, pela qual 60 a 150 mL de solução salina são infundidos, e, posteriormente é realizada massagem via palpação retal para melhor difusão do conteúdo no órgão. O líquido oriundo dessa drenagem é usado para a realização da cultura bacteriana e, quando centrifugado, também podem ser feitas amostras para citologia (BALL et al., 1988; LEBLANC et al., 2007).

Para a avaliação dos resultados Riddle e colaboradores (2007), relataram que a recuperação de 2–5 PMNs por campo 400x e/ou uma monocultura de bactéria são considerados diagnósticos de endometrite, estando associados a taxas reduzidas de prenhez.

### **3.1.2 Tratamentos para endometrite**

São várias as formas descritas na literatura para o tratamento, sendo que trabalhos sugerem o uso de lavagem uterina, antibióticos, ecbólicos e anti-inflamatórios. Porém, o uso indiscriminado de antibióticos é capaz de alterar a resistência das bactérias causadoras de doenças tornando o medicamento ineficaz no seu combate, podendo prejudicar outras

bactérias que auxiliam o organismo em seu funcionamento correto. Portanto, tornam necessário o estudo de terapias alternativas, de modo a aumentar a potência do sistema imune e, conseqüentemente, a resistência desses animais às doenças.

A ocitocina é um fármaco do grupo dos ecbólicos, e, é uma das alternativas descritas como suporte ao tratamento da endometrite. O seu uso está relacionado ao efeito de intensificação das contrações do músculo endometrial auxiliando, assim, na expulsão do conteúdo uterino por meio do colo do útero e do sistema linfático (CADARIO et al., 1995; RASCH et al., 1995; ALLEN, 1991). A ocitocina deve ser administrada antes da inseminação ou monta natural e no intervalo entre quatro e 72 horas após a ovulação, sem causar danos ao possível embrião. (BRINSKO et al., 1991). Já o cloprostenol, que é um análogo da prostaglandina, é responsável por ativar o miométrio de forma mais prolongada quando comparado à ocitocina, sendo usado nos casos de éguas com úteros mais pendulosos (LeBLANC, 2003). Contudo, esse medicamento pode causar sintomas semelhantes aos de cólicas, o que na maioria das vezes não é desejado (IRVINE et al., 2002).

A lavagem com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é um método muito utilizado em limpeza de feridas externas e para a esterilização de instrumentos que são usados rotineiramente. A utilização de  $H_2O_2$  em infecções uterinas surgiu a partir da descoberta de que bactérias que sintetizam essa substância, como os lactobacilos, produzem um efeito capaz de modular o desenvolvimento de agentes nocivos à saúde da região vaginal da mulher. Para o tratamento da endometrite em éguas é recomendada a realização de lavagens uterinas com solução de ringer lactato, acrescida de solução de  $H_2O_2$  a 3% (LeBLANC e McKINNON, 2011).

As soluções iodadas são consideradas irritantes, porém, têm alta capacidade desinfetante. Com isso, em alguns casos de animais com persistência de líquido mesmo após lavagem com  $H_2O_2$  estas soluções podem ser usadas como alternativa. O iodo geralmente é diluído de 3-10 ml da solução no ringer com lactato, sendo possível acrescentar até 20 mL. E, em seguida, infundido no útero, sendo mantido ali por dois a três minutos e, posteriormente, é drenado totalmente. O líquido infundido volta para o próprio recipiente de ringer para avaliação direta de possíveis conteúdos que estavam dentro do útero (BRACHER et al., 1991).

O querosene, oriundo da destilação do petróleo, tem um alto poder irritativo na parede uterina, provocando necrose e descamação das células, favorecendo a renovação do epitélio. Quando o útero apresenta biofilmes formados por bactérias, as soluções rotineiras não são capazes de removê-los por não penetrarem em sua matriz. Quando se usa o querosene, é possível a retirada do biofilme através da descamação uterina. Existem algumas ressalvas com relação a sua utilização, sendo um método bastante discutido entre pesquisadores e profissionais pois os mecanismos intrínsecos envolvidos em sua ação não são bem definidos (BRADECAMP et al., 2014; LeBLANC e CAUSEY, 2009).

Sua utilização está sendo descrita com resultados positivos, em que não afetam a saúde em geral da égua e também em relação ao endométrio (PODICO et al., 2019). A aplicação de querosene remove muco, cílios e células epiteliais, permitindo a regeneração do epitélio e do aparelho mucociliar (MORRIS et al., 2020).

Em um estudo que fez a avaliação de biopsias seriadas, em média vinte e quatro horas após a infusão, o querosene promoveu uma diminuição significativa das células epiteliais ciliadas, no qual posteriormente sua concentração retorna a níveis normais quatro dias após a infusão. O mesmo parece induzir a curetagem química do epitélio endometrial, removendo de forma efetiva de microrganismos proporcionando ambiente favorável ao desenvolvimento embrionário (BRADECAMP et al, 2014). Outro trabalho realizado por Martins et al., (2006), verificaram que o querosene pode ser uma alternativa usada no tratamento de endometrite tendo em vista que é capaz de induzir uma resposta inflamatória de curta duração além de potencial antisséptico sendo considerada uma curetagem química sem ser um potencial causador de fibrose uterina.

O plasma sanguíneo auxilia nos mecanismos de defesa celular do útero por conter fatores necessários para o reparo tecidual. Sua ação de quimiotaxia, neovascularização e estímulo à mitose das células, potencializa a resposta inflamatória e a reconstituição do tecido. Além disso, o plasma sanguíneo é de fácil aquisição e de baixo custo (SEGABINAZZI et al., 2017). São várias as controvérsias sobre seu uso, por exemplo, quando se trata de plasma cruzado (aquele que veio de outro animal). Uma possível justificativa é a de que pode haver algum antígeno para o qual o animal necessitado não tenha anticorpos. Nesse caso, depara-se com a questão sanitária, em que pode haver a transmissão de doenças pelo uso de plasma exógeno e, por esse motivo, dá-se preferência ao uso de plasma autólogo.

### 3.2 Defesa uterina

Existem três fatores importantes para a proteção do trato reprodutivo da égua, chamados de mecanismos de defesa, que têm como função evitar que contaminações sejam capazes de atingir e se instalar no útero. São eles as barreiras físicas, o sistema imune e o mecanismo de depuração mecânica (LeBLANC, 2003).

A barreira física é formada por vulva, esfíncter vestibulo-vaginal e cérvix, que têm por função evitar que urina, fezes, ar e microrganismos sejam capazes de entrar no ambiente uterino (FERRIS, 2017a). Quando os animais sofrem alguma alteração na conformação desse conjunto, podem ocorrer contaminações recorrentes. Baixa condição de escore corporal, múltiplas partições e idade avançada são fatores capazes de predispor o animal a essas condições (LeBLANC, 2003).

Quando, por algum motivo, essas barreiras não são capazes de proteger e o patógeno ou agente contaminante consegue invadir o útero, a resposta imune inata é ativada. Ela é desencadeada logo que o organismo percebe a presença de um corpo estranho, ou seja, reconhece um antígeno e sinaliza para as células epiteliais, nesse caso, as células da mucosa endometrial. Esse mecanismo tem como funções principais atrair células do sistema imune para o local por meio de quimiotaxia, eliminar células mortas através da cascata complemento e formar antígenos através do sistema imune adaptativo (MARTH et al., 2018; NASH et al., 2010).

Os microrganismos possuem em sua superfície padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Os PAMPs aderem-se às imunoglobulinas IgG e IgM e ativam o sistema complemento por meio da via clássica, através de C3 e C5, que é usada para fazer a fagocitose não específica de células e microrganismos que sofreram danos. (KUMAR et al.; 2019).

A ativação da cascata do sistema complemento estimula a formação de leucotrienos, prostaglandina E, prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  e outros derivados do ácido araquidônico, que atuam como agentes de quimiotaxia para neutrófilos (PYCOCK e ALLEN, 1990).

Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune a responderem aos estímulos pela imunidade inata, que é responsável pela lise celular através de suas

enzimas. Essas enzimas fagocitam o agente invasor logo após a ligação do patógeno com o fagócito, o qual é englobado e destruído no fago lisossomo. (LÖGTERS et al. 2009; CRUVINEL et al., 2010).

São várias as imunoglobulinas encontradas no útero, sendo que IgA e IgG são produzidas no órgão de acordo com a necessidade. A IgA é sintetizada localmente no útero (DHALIWAL et al, 2001) e é a principal imunoglobulina de defesa da mucosa do trato reprodutivo contra agentes patogênicos.

Porém, alguns trabalhos sugerem que não necessariamente aqueles animais com maior susceptibilidade à endometrite possuem maiores concentrações de imunoglobulinas. Por outro lado, animais mais resistentes à afecção podem apresentar quantidades reduzidas de imunoglobulinas quando comparados a animais suscetíveis. Portanto, este não pode ser um parâmetro para comparação entre os animais (LeBLANC et al., 1994; CHRISTOFFERSEN et al., 2015; BEEHAN et al., 2015; MA et al., 2006).

Os espermatozoides, assim como os agentes patogênicos, são capazes de induzir uma resposta inflamatória no útero, o que envolve a ativação da cascata complemento e faz com que haja quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs) para o local (WATSON et al., 1987; PYCOCK et al., 1990).

O mecanismo de limpeza uterina é importante contra a permanência da inflamação no órgão. Alguns animais não são capazes de realizar essa depuração mecânica, por falha nos aparatos necessários para que esse processo ocorra. Múltiplos partos, esfíncter vestibulo vaginal afuncional, canal vaginal alongado, cérvix com anomalias, útero com algum grau de pendulosidade, degeneração vascular, linfangiectasia e aparato mucociliar comprometido são alguns dos principais fatores que culminam na dificuldade de drenagem uterina (EVANS et al., 1987).

Em um estudo realizado por Allen e Pycock (1990), foi possível observar que éguas com susceptibilidade à endometrite possuem uma queda na contratilidade do útero. Portanto, as secreções que não são expelidas podem favorecer o crescimento de microrganismos oportunistas, aumentando as chances de patologias. Essas observações corroboram com os achados de Troedsson e colaboradores (1993), que observaram em éguas acometidas pela endometrite a produção deficiente de citocinas anti-inflamatórias, assim como o comprometimento na duração e intensidade das contrações miometriais.

A contração miometrial está relacionada ao sistema imune, mais especificamente quanto à indução da produção de óxido nítrico (NO) pelas citocinas. O NO é capaz de induzir o relaxamento do músculo liso sem depender das concentrações circulantes de cálcio (GRISCAVAGE et al., 206; LIU et al., 1997). As interleucinas-1 (IL1) e interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), que são mediadores pró-inflamatórios, provocam a maior produção de NO e, portanto, causam diminuição na atividade da musculatura lisa, prejudicando a depuração uterina (ALGHAMDI et al., 2006).

A resposta imune é afetada de forma significativa através da fase do ciclo estral em que o animal se encontra. Quando em diestro, ou seja, sob efeito da progesterona, o órgão se torna sensível à infecção. Já na fase de estro, com domínio do estrógeno, o sistema imune é mais atuante e com maior capacidade de debelar infecções. (EVANS et al., 1986). Como exemplo, em estudo feito com a incubação de bactérias no diestro e no período de 3 horas subsequentes, foi observado aumento de amiloide sérica A (SAA) e de IL10. Porém, quando o mesmo foi feito no período de estro, não houve aumento bacteriano significativo. (BOWDISH et al., 2006; NASH et al., 2010).

### **3.3 Lipopolissacarídeo bacteriano**

O lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina bacteriana é uma molécula encontrada abundantemente na membrana externa das bactérias gram-negativas e possui alta capacidade de estimular a resposta imune inata através do mecanismo de quimiotaxia. (ALEXANDER e RIETSCHER, 2001). O LPS é usado para simular a resposta imunológica à infecção bacteriana para fins de pesquisa, porém, sem causar a doença propriamente dita, não trazendo riscos para os animais (CECILIANI et al., 2012).

O LPS é capaz de ocasionar febre, taquicardia e choque séptico quando usado em concentrações elevadas. Porém, em doses baixas, pode agir como um imunomodulador ativo. Estudos prévios foram capazes de avaliar que a infusão do LPS de *E.coli* aumentou o influxo de neutrófilos para o útero de éguas e vacas em quantidade significativa, sem causar sintomas sistêmicos de infecção (ESCADON et al., 2020 ; SHARMA et al., 2010).

A utilização do LPS é o padrão ouro para estudos que envolvem a resposta de fase aguda (RFA), tendo em vista que os fatores desencadeados por ele são similares a uma infecção por bactérias Gram-negativas. Isso possibilita a coleta de amostras para a

verificação de marcadores desta resposta, principalmente as proteínas de fase aguda (PFA) e as citocinas (CECILIANI et al., 2012).

### 3.4 Ozonioterapia

O gás ozônio ( $O_3$ ) é composto por três moléculas de oxigênio e apresenta uma estrutura triatômica. Devido a essa conformação, é uma molécula instável por possuir estados mesoméricos, ou seja, decompõe de forma espontânea em oxigênio diatômico. Esses fatos dificultam seu transporte e armazenamento, e, portanto, é necessário que sua produção seja no momento da utilização (RODRIGUEZ et al., 2018). Sua nomenclatura é derivada do grego “*Ozein*”, que remete a cheiro (SRIKANTH et al., 2013). Tem potencial explosivo nas suas formas líquida e sólida, não tem coloração e possui odor característico (ELVIS e EKTA, 2011).

O ozônio começou a ser utilizado no ano de 1856 por sua ação microbicida e, em 1860, passou a ser usado para a desinfecção de salas de cirurgias e para o tratamento de água (MERHI et al., 2019). Contudo, somente no século passado foi possível a demonstração de sua importância como antioxidante e anti-inflamatório, além de seu potencial efeito sobre a modulação do sistema imune (ELVIS e EKTA, 2011).

O  $O_3$  causa vasodilatação pela liberação de NO, por meio das células do endotélio. Outro efeito é o de modificação da plasticidade das hemácias, o que faz com que a circulação periférica se torne mais eficiente e, conseqüentemente, favorece a chegada de oxigênio aos tecidos. Esses fatores fazem com que as células do sistema imune se tornem mais disponíveis, assim como nutrientes e fatores de reparo tecidual, nos locais afetados por algum dano (RECIO DEL PINO et al., 1999).

Na medicina, o  $O_2$  é utilizado associado ao  $O_3$ , tendo o nome de ozonioterapia. O  $O_3$  vai separar-se da água e liberar uma forma reativa do oxigênio, que por sua vez vai fazer com que aconteça o processo de oxidação das células, deixando o  $O_2$  e o trifosfato de adenosina (ATP) mais disponíveis para serem utilizados. (CASE et al., 2012; BHATT et al., 2016).

Existem diversas formas de se fazer o uso do  $O_3$ . As mais comuns são a via sistêmica, conhecida como auto-hemoterapia ozonizada, na qual o gás é misturado ao sangue e aplicado novamente no paciente (SAGAI e BOCCI, 2011; BOCCI,

1994a; BOCCI, 2006) e a via local, podendo-se utilizar água, soro ou óleo ozonizados (DURICIC' et al., 2012a).

A aplicação também pode ser feita pelas vias intramuscular, vertebral, retal, vaginal e oral. A inalação não deve ser realizada, pois o gás é nocivo ao pulmão, causando efeitos colaterais como dores de cabeça, vômitos e tosse (SMITH et al., 2017).

Em humanos, a ozonioterapia pode trazer resultados satisfatórios no tratamento de várias enfermidades, como abscessos, psoríase, síndrome da imunodeficiência adquirida, doenças hepáticas, feridas crônicas, doença de Parkinson, sepse, sinusites, cáries dentárias, pé diabético, doença cardíaca, asma, câncer, uveíte, cistite e infecções na cavidade oral (BAYSAN e LYNCH, 2005; RE et al., 2008; ZHANG et al., 2014; MERHI et al., 2019). O O<sub>3</sub> pode, ainda, ser usado para tratar hérnias de disco pela desidratação do núcleo pulposo, em decorrência de sua ação nos glicosaminoglicanos (MURPHY et al., 2016).

#### **3.4.1 Ozônio como antioxidante**

O O<sub>3</sub> é um excelente oxidante pelo seu poder redox, e, é capaz de aumentar as propriedades antioxidantes de estruturas afetadas por patologias (WEAST, 1970; MUÑOZ, 1993).

O gás é capaz de reagir com as moléculas presentes nas membranas das células, podendo ser lipídeos ou proteínas (CLAVO et al., 2019). No caso dos lipídeos, por apresentarem efeitos de oxidação, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vai ser formado (BOCCI et al., 2009; BOCCI et al., 2011; VIEBAHN-HANSLER et al., 2012). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de promover a síntese de proteínas, que favorecem a sobrevivência celular (RE et al., 2014; GALIE et al., 2018; SINISCALCO et al., 2018; WANG et al., 2018). Quando acontece a degradação de fatores intrínsecos as células, ocorre um sinal rápido de estresse oxidativo transitório, ativando a síntese de outras substâncias. Esse processo representa a base do fenômeno paradoxal, para o qual uma molécula oxidante, como o O<sub>3</sub>, desencadeia uma potente reação antioxidante, ou seja, através da formação de segundos mensageiros (peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos, ozonídeos) e lipídios oxidados que são responsáveis por estimular ou modular tanto a resposta antioxidante endógena como a resposta imunológica do hospedeiro (Rodríguez et al., 2018).

A aplicação de O<sub>3</sub> tem ações diferentes, dependendo de sua concentração. Em concentrações mais baixas, ele regula a proliferação, diferenciação e aumento dos sistemas antioxidantes. Em altas concentrações, causa estresse oxidativo, apoptose e necrose (CLAVO et al., 2019). Os efeitos terapêuticos do O<sub>3</sub> são dependentes da dose, por isso, o conhecimento acerca das concentrações adequadas dos produtos de ozonização no local do problema é crucial para evitar a toxicidade (BOCCI, 1994b; BOCCI, 1996).

Quando ocorrem sobrecargas no sistema antioxidante, os efeitos adversos relacionados ao O<sub>3</sub> aparecem, podendo deixar os tecidos lesionados. A toxicidade pode estar relacionada aos seguintes acontecimentos: grande formação de radicais livres e intermediários reativos, peroxidações lipídicas, perda oxidativa de grupos funcionais e atividades de biomoléculas incluindo enzimas, alterações da permeabilidade e funções da membrana e início de processos secundários (MUSTAFA, 1990).

### **3.4.2 Resposta Imunológica do Ozônio**

O O<sub>3</sub> é capaz de modular o sistema imunológico através de estímulos em suas células (SÁNCHEZ et al., 2012). Tal fato pode ser explicado pela reação do gás com os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e alguns outros antioxidantes. Quando há a formação de peróxidos, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de se difundir nas células do sistema imunológico e controlar a transdução de sinais e respostas celulares (CALISKAN et al., 2011).

O ozônio é capaz de agir em mediadores imunológicos diferentes, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o TGF-β, em última análise, induzindo sua ação (ZHANG et al., 2014). Quando administrado em baixas doses, o ozônio é capaz de aumentar a secreção de macrófagos e leucócitos e de inibir a síntese de prostaglandinas e a liberação de bradicinina (ORAKDOGEN et al., 2016).

### **3.4.3 Ação do Ozônio nos patógenos**

O ozônio é eficaz atuando em diferentes microrganismos. Nas bactérias reage com aminas bacterianas, aminoácidos, ativados compostos aromáticos e resíduos de enxofre reduzidos (VON GUNTEN, 2003). Além desses, o O<sub>3</sub> é capaz de reagir com ligações insaturadas de fosfolipídios, proteínas, peptidoglicanos e lipossacarídeos na superfície da célula bacteriana (MCNAIR SCOTT E LESHER, 1963). Portanto, após a ocorrência de

danos na membrana por ação da oxidação, a permeabilidade é alterada e as moléculas de ozônio conseguem penetrar nas células (BÜNNING e HEMPEL, 1996).

Sob microscopia eletrônica, Thanomsub e colaboradores (2002) verificaram uma alteração da membrana e a consequente lise celular pela ação do ozônio. Portanto, o seu uso como antimicrobiano é de grande valia para diminuir a quantidade de bactérias nas feridas e agilizar o processo cicatricial.

A associação do uso de O<sub>3</sub> com a clorexidina é capaz de aumentar a ação contra bactérias e leveduras (BORGES et al., 2017). Foi verificado que a utilização do O<sub>3</sub> é capaz de reduzir drasticamente a colonização de *Staphylococcus aureus* quando avaliadas culturas em placas (DYAS et al., 1983; YAMAYOSHI e TATSUMI, 1993). Outros autores verificaram a utilização e a aplicação de O<sub>3</sub> em forma gasosa em roedores, onde foi possível observar que ele é capaz de evitar o crescimento bacteriano (SILVA et al., 2009).

A utilização do ozônio é eficiente, também, contra bactérias resistentes a antibióticos e genes da resistência a antibióticos, como observado por Stange e colaboradores (2019). Foi possível verificar que, mesmo em baixas concentrações de ozônio (1mL/L), 99% das bactérias resistentes a antibióticos foram eliminadas.

Por fim, o O<sub>3</sub> é capaz de inativar vírus através de peroxidação lipídica e proteica (WELLS et al., 1991; MURRAY et al., 2008). Nos fungos, ele afeta os meios referentes à oxidação, que são utilizados pelas membranas celulares e vem sendo aplicado de forma mais constante para os fungos dermatófitos (*Epidermophyton*, *Microsporum*, e *Trichophyton*), sendo potencial fungicida e inibidor do mecanismo de oxidação (OUF et al., 2016).

#### **4. HIPÓTESES**

- O tratamento com O<sub>3</sub>, em dose única ou repetida (dois dias consecutivos), diminui a inflamação após a inoculação de LPS;
- O tratamento repetido com O<sub>3</sub> é mais eficiente do que a aplicação única na diminuição da inflamação.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Animais**

Todos os procedimentos utilizados nesse experimento foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, protocolo nº 030/2021, determinadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, Brasil.

O estudo foi realizado em parceria com o haras OGT, em Piumhi- MG. Foram avaliadas 20 éguas, Mangalarga Marchador e Mestiças receptoras de embrião, com idade variada (3-15 anos), selecionadas por meio do histórico reprodutivo (animais que já passaram pela estação reprodutiva e perderam embrião mais de uma vez, que possuíam acúmulo de líquido intrauterino, idade avançada acima de 8 anos ou múltiplas parições. Esses animais não estavam sendo utilizados para fins reprodutivos pois haviam sofrido perdas embrionárias nas estações anteriores.

### **5.2 Procedimentos Experimentais**

Os animais foram acomodados em tronco de contenção próprio para equinos e a cauda envolvida com faixa e elevada para evitar possíveis contaminações durante os procedimentos. A região perineal foi higienizada com solução degermante clorexidine 2% e a secagem feita utilizando toalhas descartáveis.

Todos os animais em fase estrogênica receberam 100 µg de LPS de *E.coli* (do sorotipo *E. coli* L2654, contendo 10.000 unidades de endotoxina por mg de LPS; Sigma, EUA) diluídas em solução salina estéril, por via intrauterina. Para a definição da fase estrogênica, foi detectada a presença de folículo dominante ( $\geq 35$ mm de diâmetro) e edema do endométrio (Figura 1). A inoculação do LPS intrauterino foi realizada com o auxílio de uma pipeta de inseminação artificial (IA) e, após ultrapassar a cérvix, o conteúdo foi injetado com o auxílio de uma seringa. Para garantir que todo o volume de LPS foi direcionado ao útero, mais 5 mL de solução salina foram injetados para lavar a pipeta. Todos os materiais utilizados nesse processo eram descartáveis.

Figura 1: A - folículo dominante  $\geq 35$  mm de diâmetro / B - Edema uterino



Fonte: Do autor

Figura 2: A – LPS de *E.coli* / B – inoculação do LPS com uso de pipeta de IA



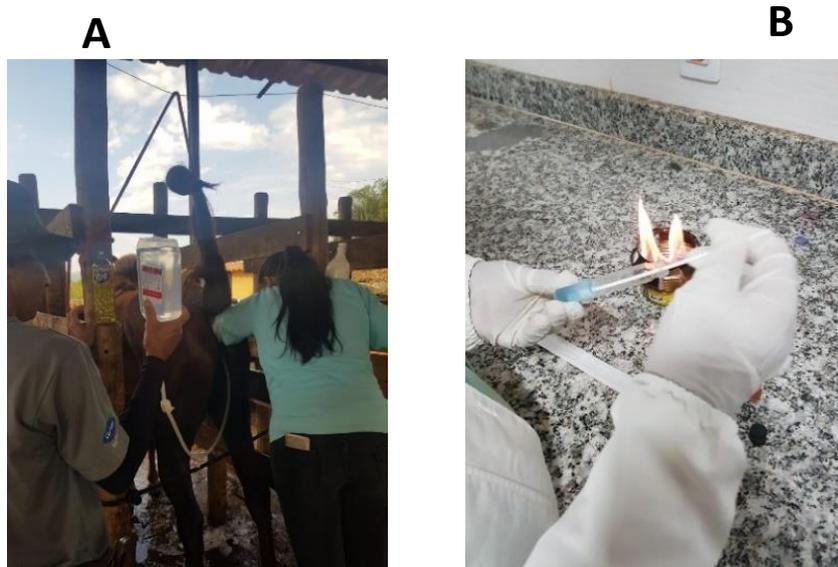
Fonte: Do autor

Um dia antes da inoculação de LPS (D0), foram realizados exames de cultura, citologia, biópsia e coleta de sangue para ser possível avaliar a situação individual de cada animal.

Para a cultura, o procedimento realizado para a coleta das amostras foi o lavado de baixo volume (LBV) (Figura 3). Com o auxílio de uma sonda de silicone, 100 mL de

solução salina estéril foram infundidos no útero. Através de palpação transretal, foi feita massagem para que o líquido percorresse toda a cavidade uterina. Posteriormente, o líquido foi recolhido em recipiente estéril e levado ao laboratório, onde foi centrifugado a 3600 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi coletado utilizando *swab* estéril. As amostras foram transferidas para o meio de transporte *Stuart*, resfriadas e transportadas para o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas as análises para isolamento e caracterização de bactérias e fungos.

Figura 3: A – Coleta para cultura realizada através do LVB / B – material oriundo da centrifugação do LBV sendo colocado no meio de *Stuart*



Fonte: Do autor

Na coleta do material citológico, foi utilizado coletor descartável e estéril envolvido com camisa sanitária (PROVAR® - São Paulo, Brasil). Ao transpor a cérvix, a camisa sanitária foi rompida e o coletor inserido na cavidade uterina. Em seguida, o coletor foi recolocado na camisa sanitária para então ser retirado do útero.

O esfregaço foi feito através do deslizamento em movimentos rotatórios da escova coletora na lâmina (Figura 5) que, após a secagem, foi corada com kit panóptico rápido, de acordo com a metodologia descrita por Nielsen (2005). Um único avaliador foi responsável pela caracterização das lâminas, contabilizando, assim, a quantidade de PMNs em relação às células endometriais.

Figura 4: Coleta de material para citologia endometrial



Fonte: Do autor

Figura 5: Confeção da lâmina para exame de citologia endometrial



Fonte: Do autor

O material para biópsia foi coletado com pinça de Schumacher própria para coleta. Quando o cérvix foi ultrapassado chegando até o colo do útero, um fragmento do órgão foi retirado e acondicionado em solução de formol tamponado para posterior fabricação das lâminas histológicas (Figura 7). As análises para caracterização do tecido endometrial em relação a presença de infiltrados inflamatórios foram realizadas pelo Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Lavras.

Figura 6: Coleta e armazenamento de biópsia uterina



Fonte: Do autor

### 5.3 Tratamentos

Os animais foram alocados de forma aleatória em três tratamentos: Tratamento Ozônio1 (TO1) n = 8, Tratamento Ozônio 2 (TO2) n = 7 e o Tratamento Controle Negativo (TCN) n = 5.

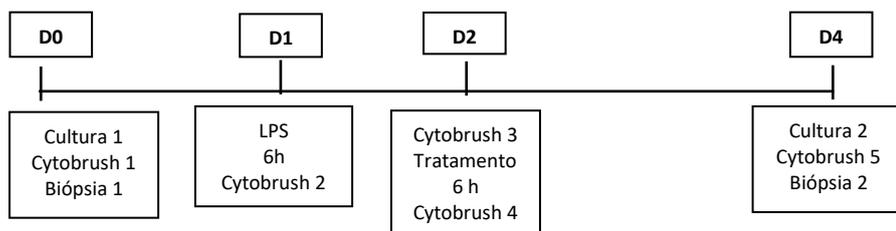
Figura 7: Infusão intrauterina de ozônio



Fonte: Do autor

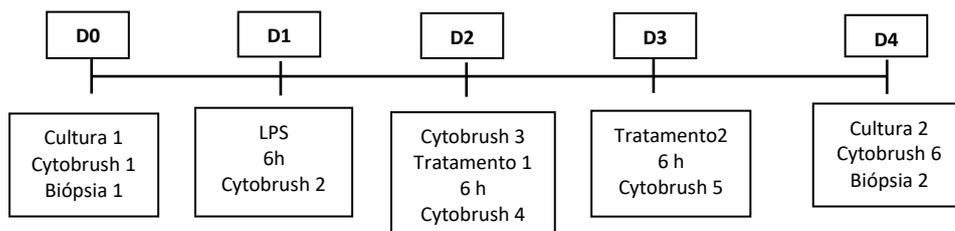
### 5.3.1 Tratamento Ozônio 1 (TO1)

No grupo ozônio 1, os animais receberam o gás diretamente no útero através de insuflação por seis minutos, na concentração de 35 mg/mL, com fluxo de 0,25 L/mm, sendo disponibilizados 1,5 litros de gás para cada animal. Após esse processo, o útero foi massageado via palpação retal para melhor dispersão.



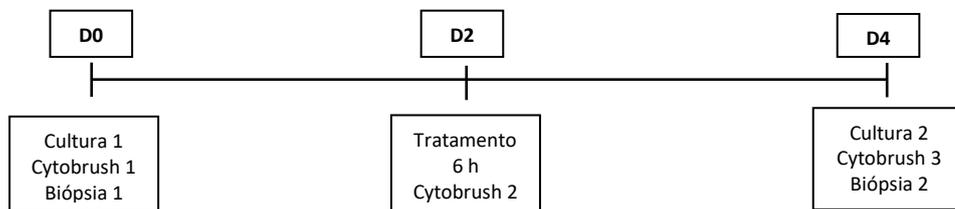
### 5.3.2 Tratamento Ozônio 2 (TO2)

No grupo ozônio 2, os animais receberam o mesmo tratamento do grupo ozônio 1, porém, as aplicações foram realizadas em dois dias consecutivos.



### 5.3.3 Tratamento controle negativo (TCN)

Os animais não receberam LPS, mas somente uma aplicação de ozônio, como no tratamento 1, para avaliação de possíveis efeitos indesejados ocasionados pelo uso do ozônio.



No dia seguinte às primeiras coletas, caracterizado como D1, foi aferida a temperatura retal de cada animal e, logo depois, receberam o LPS. Seis horas após a infusão, foram realizadas coleta de exame citológico através do *swab* uterino, além da verificação da temperatura. No D2, antes do tratamento, foram coletadas novas amostras para citologia, com a finalidade de descartar animais resistentes à infecção. Logo em seguida, os animais receberam o tratamento com O<sub>3</sub> e 6 horas após, novas amostras para citologia. No D3, os animais alocados no tratamento 2 receberam novamente o tratamento com O<sub>3</sub> e, seis horas depois, novas coletas citológicas foram realizadas. No D4, foram feitas coletas para cultura, exames citológicos e biópsia.

## **6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as análises foram realizadas com o uso do JMP Pro 12 (SAS). Os efeitos fixos de tratamento, período (citologia) e interação foram avaliados por modelo misto e estrutura de covariância de menor valor de akaike. O termo de erro aleatório foi animal dentro de tratamento. As médias foram avaliadas pelo teste pareado de Student, sendo valores de p abaixo de 0,05 e de 0,10 considerados como diferença e tendência, respectivamente. Médias são representadas com médias dos quadrados mínimos e erros padrões das médias.

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do LPS de *E. coli* tem por objetivo o aumento significativo do influxo de neutrófilos para o lúmen uterino. Este fato já foi verificado em estudos anteriores em éguas saudáveis e em vacas com endometrite em um nível relevante (WILLIAMSON et al., 1987; SINGH et al., 2000). Os achados corroboram com os dados desta pesquisa, em que houve diferença estatística ( $P < .001$ ) quando foram comparadas as citologias realizadas 24 horas antes e 6h depois da infusão do LPS, sendo citologia 1 ( $0.77 \pm 2.7$ ) e citologia 2 ( $8.86 \pm 2.7$ ) no TO1, e no TO2 citologia 1 ( $0.37 \pm 2.9$ ) e citologia 2 ( $10.9 \pm 2.9$ ). Trabalhos prévios observaram o aumento no influxo de PMNs no período de 6h após a infusão do LPS (SINGH et al., 2000). Este fato está de acordo com os dados encontrados neste estudo, pois, a citologia 2 foi realizada neste mesmo período, evidenciando tal aumento.

A concentração utilizada - 100  $\mu\text{g}$  de LPS de *E. coli* (do sorotipo *E. coli* L2654, contendo 10.000 unidades de endotoxina por mg de LPS; Sigma, EUA) – foi capaz de produzir o efeito necessário para avaliar o efeito do ozônio.

É importante ressaltar que a porção capaz de causar efeito tóxico é o lipídeo A e a imunogenicidade é relacionada ao antígeno. O sorotipo 026; B6 usado neste experimento foi relatado em pesquisas anteriores para avaliação de PMNs em útero de vacas (SINGH et al., 2000) e também para estimular a liberação de IL-6, IL-8 e colônia de granulócitos em pulmões humanos (KOYAMA et al., 2000). Foi utilizado, ainda, como imunomodulador associado a ocitocina para o tratamento de endometrite (SHARMA et al., 2010) e, em éguas pôneis (MOLLETT et al., 1985), sem causar qualquer efeito sistêmico adverso.

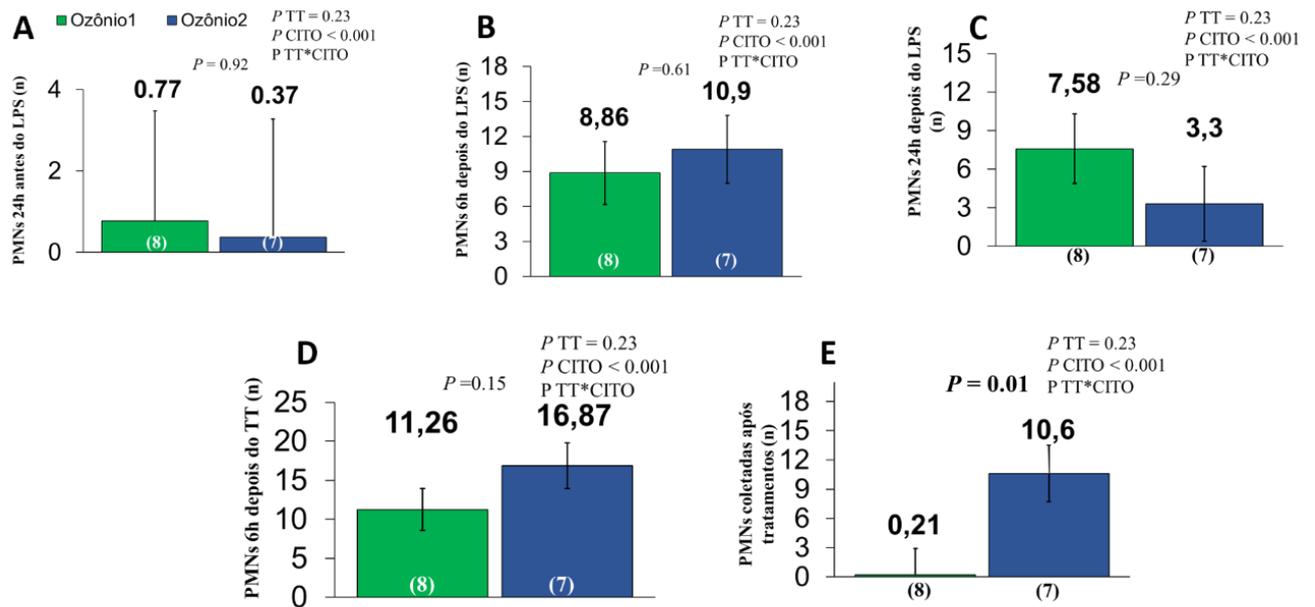
Uma das hipóteses deste trabalho era que haveria aumento da temperatura dos animais após a infusão, porém, esta não sofreu alterações significativas. Em estudo anterior, onde o LPS foi usado como imunomodulador para melhorar a qualidade uterina de animais com endometrite, os animais também mantiveram a temperatura dentro dos parâmetros fisiológicos (SHARMA et al., 2010). Isto sugere que, nesta concentração, não houve efeito sistêmico da endotoxina aplicada. Apesar de não ser possível concluir que o LPS tenha permanecido apenas na cavidade uterina, esta avaliação é sugestiva de que possivelmente não houve absorção suficiente da endotoxina para acarretar alteração da temperatura corporal.

Após a infusão com LPS, dois tratamentos foram testados, buscando avaliar a eficácia do ozônio e objetivando diminuir a quantidade de células PMNs. Foram feitas coletas citológicas ao longo do período experimental, com o intuito de verificar o comportamento das células inflamatórias em resposta ao procedimento realizado.

Duas avaliações foram realizadas: a primeira comparando os tratamentos e a segunda comparando as citologias dentro de cada um dos tratamentos. Na primeira análise (entre tratamentos), os valores de PMNs foram iguais ( $P=0.92$ ) para a citologia 1 que foi coletada 24h antes da infusão do LPS, o TO1 ( $0.77 \pm 2.7$ ) e o TO2 ( $0.37 \pm 2.7$ ). Na citologia 2, a quantidade de PMNs também foram semelhantes ( $P= 0.61$ ), sendo  $8.86 \pm 2.7$  para TO1 e  $10.9 \pm 2.9$  para TO2. Na citologia 3, os valores foram  $7.58 \pm 2.7$  para o grupo TO1 e  $3.30 \pm 2.9$  para o grupo TO2. Os valores de PMNs foram semelhantes ( $P=0.23$ ) entre os grupos TO1 ( $11.26 \pm 2.7$ ) e TO2 ( $16.87 \pm 2.9$ ) na citologia 4 realizada 6h após o tratamento. Na citologia 5 os valores de PMNs foram diferentes ( $P=0.01$ ), sendo TO1 ( $0.21 \pm 2.7$ ) e TO2 ( $10.6 \pm 2.9$ ).

Baseado nesses resultados foi possível observar que apenas uma aplicação de insuflação uterina com ozônio na concentração sugerida (insuflação por seis minutos, na concentração de 35 mg/mL, com fluxo de 0,25 L/mm, sendo disponibilizados 1,5 litros de gás para cada animal), pode ser eficiente para o tratamento da endometrite em éguas (Figura 9).

Figura 8: Efeito do tratamento com insuflação uterina de ozônio na contagem de células PMNs de éguas induzidas à endometrite com LPS de *E.coli*.



A= Número de células PMNs 24h antes do LPS - coletas em éguas Mangalarga Marchador e mestiças. B=Número de células PMNs 6h depois do LPS. C= Número de células PMNs 24h depois do LPS. D=Número de células PMNs 6h depois dos TT. E=Número de células PMNs coletadas no tratamento 1, 48h (4d) após administração de ozônio, e no tratamento 2, após 6h (3d) da administração de ozônio. Diferenças foram consideradas com valor de  $P \leq 0.05$ .

O número de PMNs foi menor ( $P = 0.01$ ) na citologia 1 do TO1 ( $0.77 \pm 2.5$ ), comparado com as citologias 2, 3 e 4 ( $8.86 \pm 2.5$ ,  $7.58 \pm 2.5$  e  $11.26 \pm 2.5$ , respectivamente, posteriormente na citologia 5 no número de PMN foi semelhante a citologia 1 ( $P = 0.01$ )  $0.21 \pm 2.5$  demonstrando o possível efeito do ozônio.

No TO 2, os resultados para PMNs também diferiram ( $P < 0.001$ ), sendo que para as citologias 1,2,3,4,5 e 6 os valores foram  $0.36 \pm 3.12$ ,  $10.90 \pm 3.12$ ,  $3.30 \pm 3.12$ ,  $16.86 \pm 3.12$ ,  $10.57 \pm 3.12$  e  $0.07 \pm 3.12$ , respectivamente, sendo a sexta citologia realizada 24 horas após a segunda insuflação com ozônio.

No TCN, foi possível avaliar os animais levando em consideração apenas o efeito do ozônio, já que esse grupo não recebeu infusão de LPS. Os valores de PMNs foram diferentes ( $P = 0.002$ ), sendo que nas citologias 1, 2 e 3 a média de PMNs foi de  $0.82 \pm 1.3$ ,  $10.38 \pm 1.3$ ,  $0.18 \pm 1.3$  respectivamente.

Sendo assim, entende-se que o próprio gás pode ser capaz de atrair células do sistema imunológico para o local onde está sendo aplicado e, com isso, melhorar as condições do ambiente ao seu redor.

Tabela 1: Comparação das citologias em cada tratamento realizado em égua submetidas à endometrite induzida por LPS

TT	Citologia						P - valor
	1	2	3	4	5	6 <sup>2</sup>	
TO1	0.77±2.5 <sup>aA</sup>	8.85±2.5 <sup>bc</sup>	7.57±2.5 <sup>cB</sup>	11.25±2.5 <sup>bc</sup>	0.20±2.5 <sup>a</sup>	-	0.01
TO2	0.36 ± 3.12 <sup>c</sup>	10.90±3.12 <sup>ab</sup>	3.30±3.12 <sup>bc</sup>	16.86±3.12 <sup>a</sup>	10.57±3.12 <sup>ab</sup>	0.07±3.12 <sup>c</sup>	<0.001
TCN	0.82±1.3 <sup>a</sup>	10.38±1.3 <sup>b</sup>	0.18±1.3 <sup>a</sup>				0.002

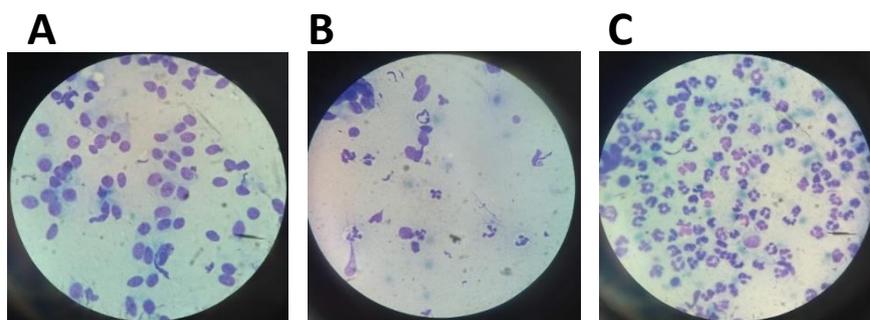
\*TO1: administração única do gás ozônio (35 mg/mL) no útero via insuflação por 6 minutos; TO2: mesmo procedimento de TO1, porém, realizado em dois dias consecutivos; TCN: sem LPS e administração única de ozônio.

<sup>2</sup>A citologia 6 foi realizada no TO2, vinte e quatro horas após a última infusão de O<sub>3</sub>

<sup>abc</sup> Diferem ( $P \leq 0.05$ ) na mesma linha.

ABC tendência ( $P > 0.05 \leq 0.10$ ).

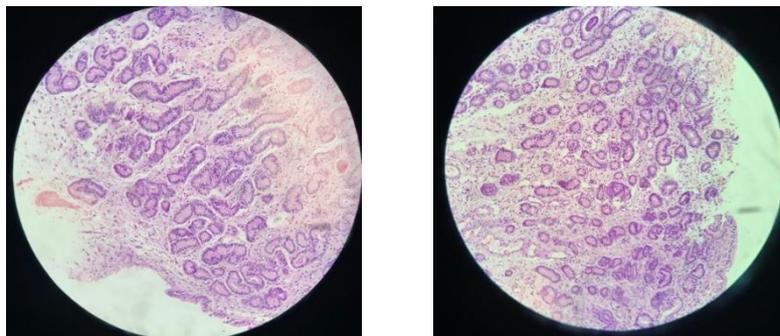
Figura 9: A – Células endometriais normais / B - Presença de PMNs em citologia endometrial. Grau moderado de acometimento, aumento de 1000X e grau intenso (C) aumento de 1000X



Fonte: Do autor

Foram avaliados todos os campos de cada lâmina de histologia para verificação do estado inflamatório de cada amostra segundo a classificação de Bastos e Masuda (2009).

Figura 10: A - Corte histológico do endométrio normal antes e depois (B) dos procedimentos experimentais.



Fonte: Do autor

É possível observar na figura 11 que não tem presença de infiltrado inflamatório, sem fibrose e glândulas endometriais dilatadas. Sendo sugestivo de que os procedimentos realizados não causaram alterações significativas no endométrio.

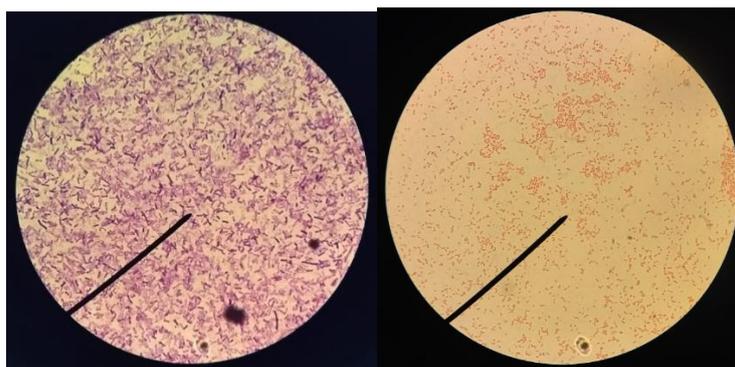
Em relação à cultura, com a realização do TO1, 12.5% dos animais que possuíam bactérias no cultivo 1 se tornaram negativos no cultivo 2, e, no TO2, 28.6%, enquanto no TCN essa porcentagem foi de 20%. Algumas amostras possuíam bactérias no cultivo 1 e continuaram positivas no cultivo 2, sendo 25% no TO1 e 28.8% no TO2. Outras não apresentaram bactérias em ambos os cultivos, 50% no TO1 e 60% no TO2. Por fim, em algumas amostras não houve crescimento bacteriano no cultivo 1, porém, o crescimento foi evidente no cultivo 2, sendo 12.5% no TO1, 42.8% no TO2 e 20% no TCN. Esses resultados sugerem que mais aplicações de ozônio são necessárias para a eliminação completa desses microrganismos e, portanto, mais estudos *in vivo* são necessários para elucidar essas questões.

Figura 11: Placa de cultura endometrial com crescimento bacteriano



Fonte: Do autor

Figura 12: Lâminas de cultura endometrial



Fonte: Do autor

Tabela 2: Efeito do tratamento no cultivo bacteriano oriundo de LBV (P=0.19)

<b>Resultado da cultura</b>	<b>Ozônio 1</b>	<b>Ozônio 2</b>	<b>TCN</b>
<b>+ cultivo 1 e - cultivo 2</b>	12.5	28.6	20.0
<b>+ cultivo 1 e +cultivo 2</b>	25.0	28.6	0.0
<b>- cultivo 1 e - cultivo 2</b>	50.0	0.0	60.0
<b>- cultivo 1 / + cultivo 2</b>	12.5	42.8	20.0

Os resultados com base na eficácia da ozonioterapia para tratamento de afecções uterinas já foi observado em alguns estudos prévios em bovinos, por exemplo, em que foi possível avaliar o aumento dos índices reprodutivos de vacas, associado a uma diminuição no uso de antibióticos (DURICIC et al., 2014; DURICIC et al., 2015a). De maneira generalizada, essa técnica pode ter resultados parecidos com os procedimentos convencionais, porém, apresenta fatores benéficos para o setor produtivo, já que não produz resíduos no leite e na carne, além do fator ambiental, aplicável à todas as espécies domésticas (ZOBEL et al., 2012a; ZOBEL et al., 2012b; DURICIC et al., 2015a; DURICIC et al., 2015b, POLAT et al., 2015; IMHOF et al., 2019).

Em um estudo realizado por Heredia 2013 a água ozonizada foi utilizada para tratar éguas que apresentavam falhas reprodutivas as seis éguas ficaram prenhas após tratadas. Outro estudo tratou endometrite causada por *Pseudomonas sp.* com lavagens

uterinas com soro ozonizado aliadas à insuflação e demonstrou significativa redução do quadro inflamatório (MONTECHIESI e IGNÁCIO 2018).

Com o presente estudo foi possível observar diminuição na quantidade de PMNs por campo avaliado, com a realização do protocolo de infusão direta do ozônio, demonstrando a eficácia do tratamento. Esses achados corroboram com os dados de um estudo feito por Ávila e colaboradores (2021), no qual verificou-se que a infusão do gás, em uma concentração superior a utilizada neste estudo, também foi eficaz para o tratamento de endometrite em éguas, assim como para diminuir a quantidade de patógenos encontrados nas amostras de cultura. Além disso, uma resposta parecida foi descrita por Escadón et al. (2020), onde foi possível avaliar a queda na quantidade de PMNs em vacas leiteiras pós-parto após infusão direta com gás ozônio.

Com base nesse estudo foi possível notar o efeito de atração de PMNs para o útero, mesmo nos casos em que não foi feita a infusão do LPS, sugerindo que o O<sub>3</sub> é capaz de realizar tal ação. Este fato pode ser atribuído à alteração na circulação do ambiente em que o O<sub>3</sub> é aplicado, onde o mesmo é capaz de favorecer a oxigenação local e, com isso, tornar as células do sistema imune, nutrientes e fatores de reparo tecidual mais disponíveis (RECIO DEL PINO et al., 1999). Isto está de acordo com os achados de Orakdogan e colaboradores (2016), que demonstraram que, quando usado em baixas doses, o ozônio é capaz de aumentar a secreção de macrófagos e leucócitos e de inibir a síntese de prostaglandinas e a liberação de bradicinina.

## **8. CONCLUSÃO**

O ozônio, em primeira instância, aumentou a quantidade de PMNs no ambiente uterino em resposta à presença da toxina bacteriana LPS, propiciando, posteriormente, a volta da normalidade endometrial ao estágio pré-infusão (redução dos PMNs). Esse resultado é um indicativo da possível eficiência do ozônio no combate e prevenção de infecções e ou inflamações endometriais em éguas.

## 9. REFERENCIAL TEÓRICO

Albihn, A.; Båverud, V.; Magnusson, U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet. Scand.* **2003**, *44*, 121–129.

ALEXANDER, C. e RIETSCHER, E. T. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* v. 7(3) p. 167-202.

Alghamdi, A.S.; Foster, D.N.; Carlson, C.S.; Troedsson, M.H.T. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2005**, *53*, 230–237.

Allen, W.E. Investigations into the use of exogenous oxytocin for promoting uterine drainage in mares susceptible to endometritis. *Vet. Rec.* 1991, *128*, 593–594.

Ansari, M.M., Dar, K.H., Tantray, H.A., Bhat, M.M., Dar, S.H., Naikoo, M., 2014. Efficacy of different regimens for acute foot rot in adult sheep. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* *1*, 114–118.

ÁVILA, Ana Caroline Araújo et al 2021. Effectiveness of Ozone Therapy in the Treatment of Endometritis in Mares. Available at SSRN 4001287.

Bain, A.M. The role of infection in infertility in the thoroughbred mare. *Vet. Rec.* **1966**, *78*, 168–173.

Baysan, A., Lynch, E., 2005. The use of ozone in dentistry and medicine. *Prim. Dent. Care* *12*, 47–52.

Beehan, D.P.; Wolfsdorf, K.; Elam, J.; Krekeler, N.; Paccamonti, D.; Lyle, S.K. The evaluation of biofilm- forming potential of escherichia coli collected from the equine female reproductive tract. *J. Equine Vet. Sci.* 2015, *35*, 935–939.

Beltaire, K.A.; Cheong, S.H.; Coutinho da Silva, M.A. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999–2011). *Equine Vet. J. Suppl.* **2012**, 84–87

Berg, L.C.; Thomsen, P.D.; Andersen, P.H.; Jensen, H.E.; Jacobsen, S. Serum amyloid A is expressed in histologically normal tissues from horses and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011, 144, 155–159.

Bhatt, J., Bhat, A.R., Kuldeep, D., Amarpal, A., 2016. An overview of ozone therapy in equine-an emerging healthcare solution. *J.E.B.A.S.* 4, 203–210.

Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of Art. *Arch MedRes* 2006;37:425-435. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.08.006.

Bocci, V., 1994a. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. *J. Int. Med. Res.* 22, 131–144.

Bocci, V., 1994b. A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the Early phase with ozone therapy (autohemotherapy). How inflammatory cytokines may have therapeutic role. *Mediat. Inflamm.* 3, 315–321.

Bocci, V., 1996. Ozone: a mixed blessing. *Res. Complement. Med.* 3, 25–33.

Bocci, V., 2006. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch. Med. Res.* 37, 425–435.

Bocci, V., Borrelli, E., Travagli, V., Zanardi, I., 2009. The ozone paradox: ozone is a Strong oxidant as well as a medical drug. *Med. Res. Rev.* 29, 646–682.

Bocci, V., Zanardi, I., Travagli, V., 2011. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J. Transl. Med.* 9, 66.

Bohn, A.A.; Ferris, R.A.; Mccue, P.M. Comparison of equine endometrial cytology samples collected with uterine swab, uterine brush, and low-volume lavage from healthy mares. *Vet. Clin. Pathol.* 2014, 43, 594–600.

Bolton, D.C., Zee, Y.C., Osebold, J.W., 1982. The biological effects of ozone on representative members of five groups of animal viruses. *Environ. Res.* 27, 476.

Borges, G.A., Elias, S.T., Mazutti da Silva, S.M., Magalhães, P.O., Macedo, S.B., Ribeiro, A.P.D., Guerra, E.N.S., 2017. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 45, 364–370.

Bowdish, D.M.E.; Davidson, D.J.; Hancock, R.E.W. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2006**, *306*, 27–66.

Brinsko, S.P.; Varner, D.D.; Blanchard, T.L. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* 1991, *35*, 1111–1119.

Buczowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M. et al. Comparação das técnicas de biópsia e cytobrush para o diagnóstico de endometrite subclínica em éguas. *Reprod Biol Endocrinol* *12*, 27 (2014). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-27>.

Bünning, G., Hempel, D.C., 1996. Vital-fluorochromization of microorganisms using-3', 6'-diacetylfluorescein to determine damages of cell membranes and loss of metabolic activity by ozonation. *Ozone Sci. Eng.* *18*, 173–181.

Cadario, M.E.; Thatcher, M.J.D.; Leblanc, M.M. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Biol. Reprod.* 1995, *52*, 495–500.

Caliskan, B., Guven, A., Ozler, M., Cayci, T., Ozcan, A., Bedir, O., Surer, I., Korkmaz, A., 2011. Ozone therapy prevents renal inflammation and fibrosis in a rat model of acute pyelonephritis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *71*, 473–480.

Canisso, I.F.; Stewart, J.; Coutinho da Silva, M.A. Endometritis: Managing persistent post-breeding endometritis. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2016**, *32*, 465–480.

Case, P.D., Bird, P.S., Kahler, W.A., George, R., Walsh, L.J., 2012. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J. Endod.* *38*, 523–526.

CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P.D.; SAUERWEIN, H. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics* v. *75*, p. 4207-4231

Cho M, Kim J, Kim JH, Yoon J, Kim JH. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research* 2010;44:3410-3418. doi:298 10.1016/j.watres.2010.03.017

Christoffersen M, Troedsson M. Inflammation and fertility in the mare. *Reprod Domest Anim* 2017;52(Suppl 3):14e20

Christoffersen, M.; Söderlind, M.; Rudefalk, S.R.; Pedersen, H.G.; Allen, J.; Krekeler, N. Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by *Streptococcus zooepidemicus*. *Theriogenology* 2015, 84, 1283–1290

Christoffersen, M.; Woodward, E.; Bojesen, A.M.; Jacobsen, S.; Petersen, M.R.; Troedsson, M.H.; Lehn-Jensen, H. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Vet. Res.* 2012, 8, 41

Clavo, B., Rodríguez-Esparragón, F., Rodríguez-Abreu, D., Martínez-Sánchez, G., Llontop, P., Aguiar-Bujanda, D., Fernández-Pérez, L., Santana-Rodríguez, N., 2019.

Clavo, B., Rodríguez-Esparragón, F., Rodríguez-Abreu, D., Martínez-Sánchez, G., Llontop, P., Aguiar-Bujanda, D., Fernández-Pérez, L., Santana-Rodríguez, N., 2019. Modulation of oxidative stress by ozone therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced toxicity: review and prospects. *Antioxidants* 8, 1–20.

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

Coelho, C.S., Abreu-Bernadi, W., Ginelli, A.M., Spagnol, T., Gardel, L.S., Souza, V.R.C., 2015. Use of ozone therapy in chronic laminitis in a horse. *J.O3.T.* 1, 30–35.

Collins, S. A study of the incidence of cervical and uterine infection in Thoroughbred mares in Ireland. *Vet. Rec.* **1964**, 66, 673–676

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; WOLDEHIWET, Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim Reprod Sci.*, v. 67, p. 135-152, 2001.

Đuričić D, Valpotić H, Žura Žaja I, Samardžija M. Comparison of intrauterine antibiotics versus ozone medical use in sheep with retained placenta and following obstetric assistance. *Reprod Domest Anim* 2016;51:538-540. doi:270 10.1111/rda.12715.

Đuričić, D., Valpotić, H., Samardžija, M., 2015a. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: current knowledge. *Anim. Reprod. Sci.* 159, 1–7.

Đuričić, D., Valpotić, H., Samardžija, M., 2015b. The intrauterine treatment of the retained foetal membrane in dairy goats by ozone: novel alternative to antibiotic therapy. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 236–239.

Đuričić, D., Valpotić, H., Zura Zaja, I., Samardžija, M., 2016. Comparison of intrauterine antibiotics versus ozone medical use in sheep with retained placenta and following obstetric assistance. *Reprod. Domest. Anim.* 51, 538–540.

Đuričić, D., Vince, S., Ablondi, M., Dobranić, T., Samardžija, M., 2012a. Effect of preventive intrauterine ozone application on reproductive efficiency in Holstein cows. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 87–91.

Đuričić, D., Vince, S., Ablondi, M., Dobranić, T., Samardžija, M., 2012b. Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. *Anim. Reprod. Sci.* 134, 119–124.

DURICIC, D.; LIPAR, M.; SAMARDZIJA, M. Ozone treatment of metritis and endometritis in Holstein cows. *Veterinarski Archiv*, v.84, n.2, p.103-110, 2014.  
DURICIC, D.; VALPOTIC, H.; SAMARDZIJA, M. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Animal Reproduction Science*, v.159, p.1-7, 2015a.

DURICIC, D.; VALPOTIC, H.; SAMARDZIJA, M. The Intrauterine Treatment of the Retained Foetal Membrane in Dairy Goats by Ozone: Novel Alternative to Antibiotic Therapy. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, p. 236-239, 2015b.

Dyas, A., Boughton, B.J., Das, B.C., 1983. Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. *J. Clin. Pathol.* 36, 1102–1104.

Elvis, A.M., Ekta, J.S., 2011. Ozone therapy: a clinical review. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2, 66–70.

Escandón BM, Espinoza JS, Perea FP, Quito F, Ochoa R, López GE, Galarza DA, Garzón JP. Intrauterine therapy with ozone reduces subclinical endometritis and improves reproductive performance in postpartum dairy cows managed in pasture-based systems. *Trop Anim Health Prod* 2020;52:2523-2528. doi: 10.1007/s11250-266 020-02298-3.

Escandón BM, Espinoza JS, Perea FP, Quito F, Ochoa R, López GE, Galarza DA, Garzón JP. Intrauterine therapy with ozone reduces subclinical endometritis and improves reproductive performance in postpartum dairy cows managed in pasture-based systems. *Trop Anim Health Prod* 2020;52:2523-2528. doi: 10.1007/s11250-266 020-02298-3.

Evans, M.J.; Hamer, J.M.; Gason, L.M.; Graham, C.S.; Asbury, A.C.; Irvine, C.H. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: Effect of steroid hormone environment. *Theriogenology* **1986**, *26*, 37–50.

Ferreira JC, Pires RH, Costa GB, Carrijo BN, Guiotto FG, Rodrigues VS. The invitro effect of ozone therapy against equine *Pythium insidiosum*. *J Equine Vet Sci*. 2021;98:103305. doi: 10.1016/j.jevs.2020.103305.

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

Frontoso, R.; De Carlo, E.; Pasolini, M.P.; van der Meulen, K.; Pagnini, U.; Iovane, G.; De Martino, L. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Res. Vet. Sci.* **2008**, *84*, 1–6.

Galie, M., Costanzo, M., Nodari, A., Boschi, F., Calderan, L., Mannucci, S., Covi, V., Tabaracci, G., Malatesta, M., 2018. Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf2 dependent pathway. *Free Radic. Biol. Med.* *124*, 114–121.

Griscavage, J.M.; Wilk, S.; Ignarro, L.J. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3308–3312.

Han, H.J., Kim, J.Y., Jang, H.Y., Lee, B., Yoon, J.H., Jang, S.K., Choi, S.H., Jeong, S.W., 2007. Fluoroscopic-guided intradiscal oxygen-ozone injection therapy for thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs. *In Vivo* *21*, 609–614.

HEREDIA, M.; Lavaje uterino com Agua ozonizada para el tratamiento de endometrites em yeguas. In: IV World Congresso f Oxygen-Ozone Therapy. International Journal of Ozone Therapy, v.12, p. 174-176, 2013.

Hughes JP, Loy RG. Investigations on the effect on intrauterine inoculation of Streptococcus zooepidemicus in the mare. Proc Am Assoc Equine Pract 1969;15:289–92.

Hultén, C.; Grönlund, U.; Hirvonen, J.; Tulamo, R.-M.; Suominen, M.M.; Marhaug, G.; Forsberg, M. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and  $\alpha$ 2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. Equine Vet. J. 2010, 34, 699–704.

Hultén, C.; Sandgren, B.; Skiöldebrand, E.; Klingeborn, B.; Marhaug, G.; Forsberg, M. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. Acta Vet. Scand. 1999, 40, 323–333. 255.

Imhof, S., Luternauer, M., Hüsler, J., Steiner, A., Hirsbrunner, G., 2019. Therapy of retained fetal membranes in cattle: comparison of two treatment protocols. Anim. Reprod. Sci. 206, 11–16.

IMHOF, S.; LUTERNAUER, M.; HÜSLER, J.; STEINER, A.; HIRSBRUNNER, G. Therapy of retained fetal membranes in cattle: comparison of two treatment protocols. Animal Reproduction Science, v.206, p.11-16, 2019.

Irvine, C.H.G.; Mckeough, V.-L.; Turner, J.E.; Alexander, S.L.; Taylor, T.B. Effectiveness of a two-dose regimen of prostaglandin administration in inducing luteolysis without adverse side effects in mares. Equine Vet. J. 2002, 34, 191–194

JANEWAY, C. A. JR; TRAVERS, M.; WALPORT, M.; et al. Immunobiology, the immune system in health and disease. New York: Garland Science Publishing; 2005

Kenney, R.M. Prognostic value of endometrial biopsy of the mare. J. Reprod. Fertil. Suppl. 1975, 23, 347–348.

Kenney, RM; Doig, PA Equine endometrial biopsy. Em *Current Therapy in Theriogenology* ; Morrow, DA, Ed .; WB Saunders Company: Philadelphia, PA, USA, 1986; pp. 723–729.

Khalifa, A.M., El Tamsahy, M.M., Abou El Naga, I.F., 2001. Effect of ozone on the viability of some protozoa in drinking water. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 31, 603–616.

Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T, et al. The potential of various lipopolysaccharides to release IL-8 and GCSF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:658–666.

Kumar, V. The complement system, toll-like receptors and inflammasomes in host defense: Three musketeers' one target. *Int. Rev. Immunol.* **2019**, 38, 131–156

Leblanc, M.; Causey, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reprod. Domest. Anim.* **2009**, 44, 10–22.

LeBLANC, M.M. Persistent Mating Induced Endometritis in the Mare: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. Recent Advanced in Equine Reproduction. International Veterinary Information Service 2003.

LeBlanc, M.M. Persistent Mating-Induced Endometritis. In *Current Therapy in Equine Medicine*, 5th ed.; Sprayberry, K.A., Robinson, E., Eds.; Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA; 2003; pp. 234–237.

LeBLANC, M.M.; CAUSEY, R.C. Clinical and subclinical endometrites in the mare: both treats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p. 10-22, 2009.

LeBlanc, M.M.; Magsig, J.; Stromberg, A.J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* **2007**, 68, 403–412. Walter 2012 LeBlanc 2007 Beltaire 2012 Frontoso 2008 Albihn, 2003

Leblanc, M.M.; Neuwirth, L.; Asbury, A.C.; Tran, T.; Mauragis, D.; Klapstein, E. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Vet. J.* 1994, 26, 109– 113

Liu, I.; Rakestraw, P.; Coit, C.; Harmon, F.; Snyder, J. An in vitro investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility. *Pferdeheilkunde* **1997**, 13, 557.

LIU, I.K.M.; TROEDSSON, M.H.T. The diagnosis and treatment of endometrites in the mare: Yesterday and today. *Therigenology*, v. 70, p. 415-420, 2008.

Lögters, T.; Margraf, S.; Altrichter, J.; Cinatl, J.; Mitzner, S.; Windolf, J.; Scholz, M. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med. Microbiol. Immunol.* **2009**, *198*, 211–219.

Ma, L.; Jackson, K.D.; Landry, R.M.; Parsek, M.R.; Wozniak, D.J. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm of 41 structure postattachment. *J. Bacteriol.* 2006, *188*, 8213–8221.

Maccari F, Volpi N. Detection of submicrogram quantities of *Escherichiacoli* lipopolysaccharides by agarose–gel electrophoresis. *AnalBiochem* 2003;322:185–189.

Marchegiani, A., Magagnini, M., Cerquetella, M., Troiano, P., Franchini, I., Franchini, A., Scapagnini, G., Spaterna, A., 2019. Preoperative topical liposomal ozone dispersion to reduce bacterial colonization in conjunctival sac and periocular skin: preliminar study in dogs. *Exp. Eye Res.* *189*, 107,848.

Marth, C.D.; Firestone, S.M.; Hanlon, D.; Glenton, L.Y.; Browning, G.F.; Young, N.D.; Krekeler, N. Innate immune genes in persistent mating-induced endometritis in horses. *Reprod. Fertil. Dev.* **2018**, *30*, 533–545.

McCue, P.M., Wilson, W.D., 1989. Equine mastitis a review of 28 cases. *Equine Vet. J.* *21*, 351–353.

McNair Scott, D.B., Leshner, E.C., 1963. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *85*, 567–576.

Merhi, Z., Garg, B., Moseley-LaRue, R., Moseley, A.R., Smith, A.H., Zhang, J., 2019. Ozone therapy: a potential therapeutic adjunct for improving female reproductive health. *Med. Gas. Res.* *9*, 101–105.

Mette, C.; Camilla Dooleweerd, B.; Stine, J.; Anders Miki, B.; Morten Roenn, P.; Henrik, L.-J.; Bojesen, A.M.; Anders Miki, B.; Petersen, M.R.; Morten Roenn, P.; et al. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, *138*, 95–105.

Modulation of oxidative stress by ozone therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced toxicity: review and prospects. *Antioxidants* 8, 1–20. Coelho, C.S., Abreu-Bernadi, W., Ginelli, A.M., Spagnol, T., Gardel, L.S., Souza, V.

MONTECHIESI, D.F.; IGNÁCIO, F.S. Ozonioterapia local para tratamento de infecção uterina em éguas. *ARS Veterinária*, v.34, n.4, suplemento, p.147, 2018.

Muñoz, A., 1993. Design and analysis of studies of the health effects of ozone. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 101, 231.

Murphy, K., Elias, G., Steppan, J., Boxley, C., Balagurunathan, K., Victor, X., Meaders, T., Muto, M., 2016. Percutaneous treatment of herniated lumbar discs with ozone: Investigation of the mechanisms of action. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 27 1242–1250.e3.

Murray, B.K., Ohmineb, S., Tomera, D.P., Jensena, K.J., Johnsona, F.B., Kirsi, J.J., Robisona, R.A., O’Neill, K.L., 2008. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *J. Virol. Methods* 153, 74–77.

Mustafa, M.G., 1990. Biochemical basis of Ozone toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 245–265.

Nash, D.M.; Sheldon, I.M.; Herath, S.; Lane, E.A. Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, 119, 31–39.

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

Nunokawa, Y.; Fujinaga, T.; Taira, T.; Okumura, M.; Yamashita, K.; Tsunoda, N.; Hagio, M. Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. *J. Vet. Med. Sci.* 1993, 55, 1011–1016

Ogata, A., Naghata, H., 2000. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 681–686.

Orakdogan, M., Uslu, S., Emon, S.T., Somay, H., Meric, Z.C., Hakan, T., 2016. The effect of ozone therapy in experimental vasospasm in the rat femoral artery. *Turk Neurosurg.* 26, 860–865.

Ouf, S.A., Moussa, T.A., Abd-Elmegeed, A.M., Eltahlawy, S.R., 2016. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. *Braz. J. Microbiol.* 47, 1–13.

Overbeck, w.; Witte, t.s.; Heuwieser, w. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, v.75, p.1311-1318, 2011.

Polat, B.; Cengiz, M.; Çolak, A.; Cannazik, O. Comparison of Intrauterine Ozone and Rifaximine Treatment in Cows with Subclinical Endometritis. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v.21, n.5, p.773-776, 2015.

Pycock, J.F.; Allen, W.E. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Vet. J.* **1990**, 22, 422–425.

Pycock, J.F.; Allen, W.E. Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis. *Vet. Rec.* **1988**, 123, 193–195.

PODICO, G., CANISSO, I. F., ROADY, P. J., AUSTIN, S. M., CAROSSINO, M., BALASURIYA, U., ELLERBROCK R. E., LIMA, F. S., FERREIA-DIAS, G., DOUGLAS, R. H. Uterine responses and equine chorionic gonadotropin concentrations after two intrauterine infusions with kerosene post early fetal loss in mares. *Theriogenology*, v. 148, p. 202-210, 2020.

Quintana, M.C.F., Domingues, I.M., Ribeiro, A.R., 2019. Uso de óleo ozonizado no tratamento de mastite subclínica em vaca Jersey: Relato de caso. *Pubvet* 13, 1–4.

Rajabi, O., Sazgarnia, A., Abbasi, F., Layegh, P., 2015. The activity of ozonated olive oil against *Leishmania major* promastigotes. *Iran J. Basic Med. Sci.* 18, 915–919.

Rasch, K.; Schoon, H.A.; Sieme, H.; Klug, E. Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rate in mares. *Equine Vet. J.* 1996, 28, 455–460.

RASMUSSEN, C.D.; PETERSEN, M.R.; BOJESSEN, A.M.; PEDERSEN, H.G.; LEHNJENSEN, H.; CHRISTOFFERSEN, M. Equine Infectious Endometritis - Clinical and Subclinical Cases. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.35, p.95-104, 2015.

Re, L., Martinez-Sanchez, G., Bordicchia, M., Malcangi, G., Pocognoli, A., Morales-Segura, M.A., Rothchild, J., Rojas, A., 2014. Is ozone pre-conditioning effect linked to

Nrf2/ EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur. J. Pharmacol.* 742, 158–162.

Ricketts, S.W.; Alonso, S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Vet. J.* 1991, 23, 185–188.

Ricketts, S.W.; Mackintosh, M.E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1987**, 35, 343–351.

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.

RODRÍGUEZ, Z.B.Z.; GONZÁLEZ, E.F.; LOZANO, O.E.L. Ozonioterapia em Medicina Veterinária. Ed. Multimídia, 2018, 282p

Rousseau, J.C., Garner, P., 2012. Biological markers in osteoarthritis. *Bone*. 51, 265–277.

Roy, D., Wong, P.K.Y., Engelbrecht, R.S., Chian, E.S.K., 1981. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 718–723.

Sagai, M., Bocci, V., 2011. Mechanism of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? *Med. Gas. Res.* 1, 1–18.

Sagai, M., Bocci, V., 2011. Mechanism of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? *Med. Gas. Res.* 1, 1–18.

Saini, R., 2011. Ozone therapy in dentistry: a strategic review. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2,151–153.

Samardžija, M., Turk, R., Sobiech, P., Valpotic, H., Harapin, I., Gračner, D., Đuričić, D., 2017. Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: A review. *Veterinarski Arhiv.* 87, 363–375.

Samardžija, M., Turk, R., Sobiech, P., Valpotic, H., Harapin, I., Gračner, D., Đuričić, D., 2017. Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: A review. *Veterinarski Arhiv.* 87, 363–375.

Sánchez, G.M., Re, L., Perez-Davison, G., Delaporte, R.H., 2012. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. *Rev. Esp. Ozonoter.* 2, 121–139.

Schwartz, A., 2015. Ozone therapy in the treatment of recurrent vulvo-vaginitis by *Candida albicans*. *Rev. Esp. Ozonoter.* 5, 99–107.

SHARMA, Sumeet; DHALIWAL, G. S. *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced immunomodulation along with oxytocin administration after mating as a treatment protocol for persistent endometritis in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 30, n. 5, p. 259-265, 2010.

Shinozuka, Y., Uematsu, K., Takagi, M., Taura, Y., 2008. Comparison of the amounts of endotoxin released from *Escherichia coli* after exposure to antibiotics and ozone: an in vitro evaluation. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 419–422.

Silva Júnior, J.I.S., Santos, C.S.F., Silva, B.M., Santos, I.F.C., Ferro, B.S., Barros, T.I.S., Tomacheuski, R.M., Simões-Mattos, L., 2019. Topical ozone therapy in the treatment of pharmacodermia in a dog (*Canis lupus familiaris*). *Acta Sci. Vet.* 47, 425

Silva, R.A., Garotti, J.E.R., Silva, R.S.B., Navarini, A., Adhemar, M.P., 2009. Analysis of the bactericida effect of ozone pneumoperitoneum. *Acta Cir. Bras.* 24, 124–127.

Silveira, A.M., Lopes, H.P., Siqueira Jr., J.F., Macedo, S.B., Consolaro, A., 2007. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanalmedications compared to single visit endodontic treatment. *Braz. Dent. J.* 18, 299–304.

Singh J, Sidhu SS, Dhaliwal GS, Pangaonkar GR, Nanda AS, Grewal AS. Effectiveness of lipopolysacchride as an intrauterine immunomodulatorin curing bacterial endometritis in repeat breedingcross bred cows. *Anim Reprod Sci* 2000;59:159–166.

Siniscalco, D., Trotta, M.C., Brigida, A.L., Maisto, R., Luongo, M., Ferraraccio, F., D'Amico, M., Di Filippo, C., 2018. Intraperitoneal administration of oxygen/ozone to rats reduces the pancreatic damage induced by streptozotocin. *Biology (Basel)* 7, 1–13.

Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res* 2017;7:212-219. doi: 10.4103/2045-9912.215752.

Smith, N.L., Wilson, A.L., Gandhi, J., Vatsia, S., Khan, S.A., 2017. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med. Gas. Res.* 7, 212–219.

Spadea, L., Tonti, E., Spaterna, A., Marchegiani, A., 2018. Use of ozone-based eye drops: a series of cases in veterinary and human spontaneous ocular pathologies. *Case Rep. Ophthalmol.* 9, 287–298.

Srikanth, A., Sathish, M., Sri Harsha, A.V., 2013. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 5, S89–S94.

Stange, C., Sidhu, J.P.S., Toze, S., Tiehm, A., 2019. Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222, 541–548.

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

Teixeira, L.R., Luna, S.P.L., Taffarel, M.O., Lima, A.F.M., Sousa, N.R., Joaquim, J.G.F., Freitas, P.M.C., 2013. Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. *Vet. J.* 197, 794–799.

Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., Poonkhum, R., Srisukonth, C., 2002. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48, 193–199.

Troedsson, M.H.T. Mating-induced endometritis: Physiology or pathology? *Vet. J.* **2014**, 199, 9–10.

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

- Tsuzuki, N., Endo, Y., Kikkawa, L., Korosue, K., Kaneko, Y., Kitauchi, A., Torisu, S., 2015. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1647–1650.
- Vaziri, K., Schwartz, S.G., Kishor, K., Flynn Jr., H.W., 2015. Endophthalmitis: state of the art. *Clin. Ophthalmol.* 9, 95–108.
- Vendruscolo, C.D.P., Moreira, J.J., Seidel, S.R.T., Fülber, J., Neuenschwander, H.M., Bonagura, G., Agreste, F.R., Baccarin, R.Y.A., 2018. Effects of medical ozone upon healthy equine joints: clinical and laboratorial aspects. *PLoS One* 13, 1–27.
- Viebahn-Hansler, R., Leon Fernandez, O.S., Fahmy, Z., 2012. Ozone in medicine: the lowdose ozone concept—Guidelines and treatment strategies. *Ozone-Sci. Eng.* 34, 408–424.
- Vigliani, A., Boniperti, E., Scudo, E., 2005. Paravertebral O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> treatment in mechanical lumbar pain in riding horses. *Riv. Ital. Ossigeno-Ozonoterapia* 4, 64–69.
- Von Gunten, U., 2003. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Res.* 37, 1443–1467.
- Walter, J.; Neuberger, K.P.; Failing, K.; Wehrend, A. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Anim. Reprod. Sci.* **2012**, *132*, 178–186.
- Wang, L., Chen, Z., Liu, Y., Du, Y., Liu, X., 2018. Ozone oxidative postconditioning inhibits oxidative stress and apoptosis in renal ischemia and reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway. *Drug Des. Devel. Ther.* 12, 1293–1301.
- Watson, E.D.; Stokes, C.R.; Bourne, F.J. Influence of arachidonic acid metabolites in vitro and in uterine washings on migration of equine neutrophils under agarose. *Res. Vet. Sci.* **1987**, *43*, 203–207.
- Weast, R.C., 1970. Handbook of chemistry and physics, 51st ed. Chemical Rubber Co., Cleveland.
- Wells, K.H., Latino, J., Gavalchin, J., Poiesz, B.J., 1991. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by ozone in vitro. *Blood* 78, 1882–1890.

Williamson P, Manyua S, Martin R, Penhale WJ. Dynamics of acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1987;35:317–325.

Xiao, W., Tang, H., Wu, M., Liao, Y., Li, K., Li, L., Xu, X., 2017. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biosci. Rep.* 9, 37–42.

Yamayoshi, T., Tatsumi, N., 1993. Microbicidal effects of ozone solution on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp. Clin. Res.* 19, 59–64.

Zargaran, M., Fatahinia, M., Zarei Mahmoudabadi, A., 2017. The efficacy of gaseous ozone against different forms of *Candida albicans*. *Curr. Med. Mycol.* 3, 26–32.

Zhang, J., Guan, M., Xie, C., Luo, X., Zhang, Q., Xue, Y., 2014. Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2014, 1–9.

Zobel, R., Tkalčić, S., Štoković, I., Pipal, I., Buić, V., 2011. Efficacy of ozone as a novel treatment option for urovagina in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 293–298. R.L. Sciorsci, et al. *Research in Veterinary Science* 130 (2020) 240–246 246

ZOBEL, R.; TKALCIC, S. Efficacy of Ozone and Other Treatment Modalities for Retained Placenta in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, p.121-125, 2012a.

ZOBEL, R.; TKALCIC, S.; STOKOVIC, I.; PIPAL, I.; BUIC, V. Efficacy of Ozone as a Novel Treatment Option for Urovagina in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.2, p.293-298, 2012b.