



**JOSÉ DA PÁSCOA NASCIMENTO NETO**

**ALTERAÇÃO NA PERFUSÃO SANGUÍNEA UTERINA  
PROMOVIDA PELA OZONIOTERAPIA INTRAUTERINA EM  
BOVINOS HÍGIDOS**

**LAVRAS-MG  
2024**

**JOSÉ DA PÁSCOA NASCIMENTO NETO**

**ALTERAÇÃO NA PERFUSÃO SANGUÍNEA UTERINA PROMOVIDA PELA  
OZONIOTERAPIA INTRAUTERINA EM BOVINOS HÍGIDOS**

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

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2024**

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

Nascimento Neto, José da Páscoa.

Alteração na perfusão sanguínea uterina promovida pela  
ozonioterapia intrauterina em bovinos hípidos / José da Páscoa  
Nascimento Neto. - 2024.

42 p. : il.

Orientador(a): Miller Pereira Palhão.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Bovino. 2. Ozônio. 3. Ultrassonografia Doppler. I. Palhão,  
Miller Pereira. II. Título.

**JOSÉ DA PÁSCOA NASCIMENTO NETO**

**ALTERAÇÃO NA PERFUSÃO SANGUÍNEA UTERINA PROMOVIDA PELA  
OZONIOTERAPIA INTRAUTERINA EM BOVINOS HÍGIDOS**

**ALTERATION IN UTERINE BLOOD PERFUSION PROMOTED BY  
INTRAUTERINE OZONE THERAPY IN HEALTHY CATTLE**

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

Aprovada em dezesseis de agosto de 2024

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. José Rafael Miranda – Universidade Federal de Lavras

Prof. Dra. Bárbara Azevedo Pereira Torres – Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. João Bosco Barreto Filho – Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Miller Pereira Palhão  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2024**

*Esse trabalho dedico primeiramente à Deus por me guiar durante esta caminhada.  
Aos meus pais, familiares e amigos pelo apoio incondicional.  
A todos vocês, o meu sincero agradecimento e eterna gratidão!*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida, por me permitirem alcançar minhas metas de vida e diversas realizações pessoais e profissionais.

Aos meus pais, Marcelino Carvalho e Lilian Nepomuceno, e a toda minha família, por sempre me incentivarem nos momentos mais difíceis e serem meu exemplo de vida.

A minha namorada, Vitoria Ferreira, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao professor e orientador Miller Palhão, por todos os conselhos, experiências e ensinamentos durante todo o período de mestrado.

Aos professores do Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução Animal, professor João Bosco Barreto e professora Bárbara Torres, por todo suporte e atenção.

Aos Departamentos de Medicina Veterinária e de Zootecnia e demais professores, pelos ensinamentos profissionais que foram de suma importância à minha formação.

Aos professores Thiago Narciso, Nadja Gomes, João Viana e José Rafael pelas valiosas considerações e experiências durante as bancas examinadoras.

Aos amigos pelo conhecimento e apoio durante todo este percurso.

Aos colegas, discentes de graduação e pós-graduação, por todo auxílio e companheirismo durante este período.

Especialmente, aos alunos que foram fundamentais durante o planejamento, coletas e análises experimentais: Giuliana Sales, Raquel Silva, Gustavo Torres, Vinicius Campos, Clara Martins, Lorena Firmino, Abihail Fuentes e Nathalia Alves.

Ao Grupo de Estudos e Extensão em Tecnologias Assistidas da Reprodução GESTAR-UFLA, pelo auxílio em todas as atividades, troca de experiências enriquecedoras e amizade.

Ao Setor de Gado de Corte, especialmente ao Núcleo de Estudos em Pecuária de Corte NEPEC-UFLA, e ao professor Daniel Casagrande pelo apoio durante os projetos de pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Animal Integrativa, Universidade Federal de Alfenas, em especial à professora Ester Caixeta, pelas orientações e experiências.

Ao Médico Veterinário Haroldo Vargas, pelo apoio acerca da ozonioterapia.

Ao corpo docente do Centro Universitário de Lavras, especialmente ao professor Luthesco Chalfun e ao NEBOL-UNILAVRAS, pelas oportunidades e aprendizados.

A Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de me tornar mestre.

Aos bovinos, pelos desafios, conhecimentos e experiências.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

Este estudo propõe avaliar alterações na perfusão sanguínea uterina promovidas pela ozonioterapia intrauterina em bovinos hípidos, verificando a segurança e viabilidade da utilização desta alternativa terapêutica, por meio da avaliação da vascularização uterina e contagem de células polimorfonucleares (PMN) endometriais. Foi realizada sincronização do ciclo reprodutivo em todos os animais (D-7 a D0), com aplicação de benzoato de estradiol (D-7) e progesterona e cloprostenol sódico (D-5). Após cinco dias, iniciou-se a coleta de amostras (D0). Os animais foram incluídos em modelo experimental *crossover*, separados em grupo controle (infusão uterina com solução fisiológica) e grupo tratamento (infusão uterina com solução fisiológica ozonizada, concentração de 50µg/mL), realizada às 0h. Avaliação do escore de descarga vaginal (EDV) e citologia endometrial para contagem de PMN foram efetuadas no início e fim de cada período experimental (0h e 72h). Foram realizadas avaliações ultrassonográficas modo-Doppler para verificação de vascularização uterina (0h, 02h, 04h, 24h e 72h). Após o término do primeiro período experimental, as fêmeas foram sincronizadas e ressubmetidas ao protocolo de coletas, invertendo o tratamento recebido. Os animais se mantiveram ausentes de endometrite subclínica durante o período experimental, não houve interação grupo x hora ( $P=0,07$ ) na concentração de PMN. Na caracterização de EDV, não houve diferença na distribuição de frequência dos animais em cada escore (1-5), entre os grupos (tratamento ou controle) em 0h ( $P=0,20$ ) e às 72h ( $P=0,70$ ). Foi observado aumento transitório na avaliação de vascularização uterina no grupo tratado, realizada às 0h e 2h, se mantendo elevada até 4h após o tratamento ( $P<0,04$ ). Este aumento promoveu maior vascularização uterina dos animais do grupo tratamento às 2h ( $P<0,02$ ) e às 24h ( $P<0,03$ ). Também houve efeito de grupo ( $P<0,04$ ), em que o grupo tratamento apresentou maior vascularização uterina ao longo das horas após a infusão. Estes achados podem ser explicados pelo maior aporte de sangue causado pelo potencial de estressor terapêutico local e vasodilatador do ozônio em doses reduzidas. Não foram observados efeitos colaterais durante o período experimental que prejudiquem a segurança e aplicabilidade desta terapia em bovinos. Contribuindo com a implementação da ozonioterapia na clínica médica de grandes animais e redução no uso indiscriminado de antibióticos na produção animal.

**Palavras-chave:** ozônio; ultrassonografia Doppler; vascularização uterina.

## ABSTRACT

This study proposes to evaluate changes in uterine blood perfusion promoted by intrauterine ozone therapy in healthy cattle, assessing the safety and feasibility of using this therapeutic alternative by evaluating uterine vascularization and endometrial polymorphonuclear (PMN) cell count. Synchronization of the reproductive cycle was performed in all animals (D-7 to D0), with the administration of estradiol benzoate (D-7), progesterone, and sodium cloprostenol (D-5). After five days, sample collection began (D0). The animals were included in a crossover experimental model, divided into a control group (uterine infusion with saline solution) and a treatment group (uterine infusion with ozonated saline solution, concentration of 50 $\mu$ g/mL), carried out at 0h. Evaluation of vaginal discharge score (VDS) and endometrial cytology for PMN count were performed at the beginning and end of each experimental period (0h and 72h). Doppler ultrasound evaluations were performed to assess uterine vascularization (0h, 02h, 04h, 24h, and 72h). After the end of the first experimental period, the females were synchronized and resubmitted to the collection protocol, with the treatment received reversed. The animals remained free of subclinical endometritis during the experimental period, and there was no group x time interaction ( $P=0.07$ ) in PMN concentration. In the characterization of VDS, there was no difference in the frequency distribution of animals in each score (1-5) between the groups (treatment or control) at 0h ( $P=0.20$ ) and 72h ( $P=0.70$ ). A transient increase in uterine vascularization was observed in the treated group at 0h and 2h, remaining elevated until 4h after treatment ( $P<0.04$ ). This increase promoted greater uterine vascularization in the treatment group at 2h ( $P<0.02$ ) and 24h ( $P<0.03$ ). There was also a group effect ( $P<0.04$ ), where the treatment group showed greater uterine vascularization over time after infusion. These findings may be explained by the increased blood supply caused by the potential local therapeutic stressor and vasodilator effect of ozone in reduced doses. No side effects were observed during the experimental period that would compromise the safety and applicability of this therapy in cattle. This contributes to the implementation of ozone therapy in large animal clinical practice and the reduction of indiscriminate use of antibiotics in animal production.

**Keywords:** ozone; doppler ultrasound; uterine vascularization.

## **INDICADORES DE IMPACTO**

O aperfeiçoamento de abordagens terapêuticas empregadas na medicina veterinária se torna de extrema importância, visando quesitos relacionados a produção e bem-estar animal, segurança na produção de alimentos destinados ao consumo humano e demais fatores relacionados à saúde dos animais de produção. Diante disso, a pesquisa objetivou analisar a segurança e viabilidade do emprego da ozonioterapia em bovinos saudáveis, a fim de descrever alterações relacionadas a vascularização uterina dos animais analisados. A pesquisa detém de potencial impacto para ser aperfeiçoada e futuramente empregada em abordagens terapêuticas de desordens do trato reprodutivo de bovinos. Com isso, possibilitando melhorias no restabelecimento da saúde de animais doentes, e redução no uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal. Esses aspectos podem influenciar positivamente na saúde humana, considerando maior segurança na produção animal e aperfeiçoamento de abordagens empregadas na medicina veterinária, como o emprego da ozonioterapia no tratamento de doenças. Baseado em diversas vantagens da ozonioterapia na produção animal, considerando efeitos em melhorias da resposta inflamatória e no potencial de oxigenação e vascularização de tecidos. Contudo, as pesquisas ainda são escassas em relação a estas abordagens, necessitando de mais trabalhos que analisam efeitos positivos e negativos promovidos a longo prazo pelo ozônio no organismo.

## **IMPACT INDICATORS**

The improvement of therapeutic approaches employed in veterinary medicine becomes extremely important, aiming at aspects related to animal production and welfare, food safety in the production of food intended for human consumption, and other factors related to the health of production animals. In this context, the research aimed to analyze the safety and feasibility of using ozone therapy in healthy cattle to describe changes related to the uterine vascularization of the animals analyzed. The research holds the potential to be improved and eventually employed in therapeutic approaches for disorders of the bovine reproductive tract. This could enable improvements in the recovery of sick animals and reduce the indiscriminate use of antimicrobials in animal production. These aspects may positively influence human health, considering greater safety in animal production and the improvement of approaches used in veterinary medicine, such as the use of ozone therapy in the treatment of diseases. Based on the various advantages of ozone therapy in animal production, considering its effects on improving the inflammatory response and the potential for oxygenation and vascularization of tissues. However, research is still scarce regarding these approaches, requiring more studies that analyze the positive and negative effects promoted by ozone in the organism in the long term.

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Delineamento experimental .....	23
Figura 2 – Caracterização de escore de descarga vaginal .....	24
Figura 3 – Imagem ultrassonográfica para avaliação de vascularização uterina .....	25
Figura 4 – Análise da imagem ultrassonográfica para contagem de pixels coloridos e totais .	26
Figura 5 – Montagem do equipamento utilizado para citologia endometrial bovina .....	27
Figura 6 – Avaliação microscópica de lâmina de citologia endometrial bovina .....	28
Figura 7 – Equipamento gerador de ozônio .....	29
Gráfico 1 – Alteração quantitativa (%) de neutrófilos polimorfonucleares entre as citologias endometriais .....	30
Gráfico 2 – Distribuição de frequência das caracterizações de escore de descarga vaginal....	31
Gráfico 3 – Alteração relativa (%) da vascularização uterina entre avaliações ultrassonográficas modo-Doppler .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NEFA	Ácido graxo não esterificado
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHB	<i>Beta hidroxibutirato</i>
D-5	Cinco dias antes do início do experimento
D0	Dia zero
D3	Dia três
dpp	Dias pós-parto
ECC	Escore de condição corporal
EDV	Escore de descarga vaginal
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	<i>Fator de necrose tumoral alfa</i>
<i>TNF-<math>\beta</math>1</i>	<i>Fator de necrose tumoral beta 1</i>
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	<i>Fator de transformação de crescimento beta</i>
<i>GM-CSF</i>	<i>Fator estimulante de colônia de granulócitos/monócitos</i>
Hp	Haptoglobina
<i>IFN-<math>\alpha</math></i>	<i>Interferon alfa</i>
<i>IFN-<math>\beta</math></i>	<i>Interferon beta</i>
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	<i>Interferon gama</i>
IL	Interleucina
<i>IL-1</i>	<i>Interleucina 1</i>
<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<i>Interleucina 1 alfa</i>
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>Interleucina 1 beta</i>
<i>IL-2</i>	<i>Interleucina 2</i>
<i>IL-4</i>	<i>Interleucina 4</i>
<i>IL-6</i>	<i>Interleucina 6</i>

<i>IL-8</i>	<i>Interleucina 8</i>
<i>IL-10</i>	<i>Interleucina 10</i>
IM	Intramuscular
MHz	Megahertz
Modo B	Modo de brilho
PMN	Neutrófilo polimorfonuclear
NOS	Óxido nítrico sintase
PGF 2- $\alpha$	Prostaglandina F2- $\alpha$
APP	Proteína de fase aguda
D-7	Sete dias antes do início do experimento
<i>TLR4</i>	<i>Toll-like receptor 4</i>
UFLA	Universidade Federal de Lavras
0h	Horário em que foi realizada a infusão uterina
2h	Duas horas após a infusão uterina
4h	Quatro horas após a infusão uterina
24h	Vinte e quatro horas após a infusão uterina
72h	Setenta e duas horas após a infusão uterina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1 Ambiente uterino .....	14
2.2 Afecções uterinas .....	16
2.3 Citologia endometrial .....	17
2.4 Ultrassonografia aplicada à reprodução de bovinos .....	18
2.5 Ultrassonografia modo-Doppler.....	18
2.6 Ozonioterapia .....	19
3. OBJETIVOS .....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Animais.....	22
4.2 Delineamento experimental.....	22
4.3 Avaliação de descarga vaginal.....	23
4.4 Avaliação de vascularização uterina .....	24
4.5 Citologia endometrial .....	26
4.6 Infusão uterina com solução ozonizada .....	28
4.7 Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS .....	30
6. DISCUSSÃO .....	333
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS .....	36

## 1. INTRODUÇÃO

O desempenho reprodutivo em sistemas de criação de bovinos pode ser mensurado pelos índices de produtividade do rebanho. A fertilidade das fêmeas é relacionada a diversos fatores que possam ser prejudiciais à saúde, como a ocorrência de doenças periparto e consequente desencadeamento de alterações sistêmicas e/ou locais. Dentre as principais afecções, a ocorrência de metrite e endometrite destaca-se como uma das principais causas de subfertilidade ou infertilidade em bovinos (Constantin e Bîrțoiu, 2016; Zobel et al., 2014). A inflamação no tecido endometrial é capaz de aumentar o período de involução uterina e o tempo necessário para retorno à função ovariana, comprometendo a saúde uterina e desempenho reprodutivo das fêmeas.

As doenças uterinas são de origem multifatorial e podem ser causadas por infecções bacterianas mistas (BICALHO et al., 2012; JEON et al., 2015). Dessa forma, as doenças uterinas apresentam potencial de ser subclínicas ou clínicas devido a intensidade do processo inflamatório. As fêmeas que manifestam doença uterina clínica apresentam redução da produção de leite, baixa fertilidade e são mais propensas ao descarte involuntário do rebanho (GIULIODORI et al., 2013; STANGAFERRO et al., 2016; WITTROCK et al., 2011). Além disso, o processo infeccioso provoca alterações morfológicas e celulares locais relacionadas ao tecido endometrial e ambiente uterino.

O status inflamatório do endométrio bovino pode ser determinado pela análise de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que são consideradas as primeiras células de defesa do organismo contra infecções (SHELDON, 2004). Atuando por meio de fagocitose dos microrganismos, em especial microrganismos opsonizados e produtos de células necróticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019), sendo essenciais no mecanismo de imunidade inata do útero. A concentração de PMN normalmente apresenta redução ao decorrer do período pós-parto, principalmente relacionada à melhoria do sistema imune uterino (Pascottini e LeBlanc, 2020).

As doenças uterinas podem afetar diretamente o funcionamento dos ovários, repercutindo no desempenho produtivo e reprodutivo das fêmeas. De forma que, pesquisas são necessárias para aprofundar o conhecimento sobre a correlação de doença uterina e funcionamento ovariano e para aperfeiçoar as medidas terapêuticas que auxiliam no controle de infecções e no reestabelecimento da saúde do animal. Assim, diversas pesquisas analisam alternativas de tratamento para infecções uterinas (ESCANDÓN et al., 2020; GIULIODORI et al., 2013; MACHADO et al., 2020). Dentre estas, a utilização de ozonioterapia no tratamento

de doenças vêm sendo discutida na medicina veterinária, como uma ferramenta promissora considerando a capacidade de reduzir o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal.

Dentre as diversas aplicações da ozonioterapia, vários pesquisadores demonstram sua utilização no tratamento de doenças, como: retenção de membranas fetais, mastite, metrite, endometrite, vaginite e urovagina (DJURICIC et al., 2012; DURICÍĆ; VALPOTIĆ; SAMARDŽIJA, 2015; SAMARDŽIJA et al., 2017). O ozônio (O<sub>3</sub>) pode ser utilizado de diversas formas, como: cremes, gases, injeções, espuma, bolus (Travagli et al., 2009), solução destilada ozonizada (ESCANDÓN et al., 2020) e spray (DURRANI, 2017). Na veterinária, a aplicação de ozônio intrauterino em bovinos pode ser realizada principalmente em forma de espuma, spray ou solução destilada ozonizada. O ozônio pode agir em diferentes microrganismos como bactérias, fungos, vírus e esporos, demonstrando ação de inibição ou inativação (BOCCI; ZANARDI; TRAVAGLI, 2011), além de romper a membrana celular de bactérias e danificar ácidos nucleicos virais (SCROLLAVEZZA et al., 1997). Por isso, o ozônio pode ser considerado uma adequada solução antisséptica no caso de infecções uterinas (Đuričić et al., 2014; Zobel e Tkalčić, 2013). Em relação a ação anti-inflamatória, pode ser baseada principalmente na inibição de citocinas pró-inflamatórias e fosfolipase A2, além do estímulo em citocinas imunossupressoras, como a *interleucina 10 (IL-10)* e o *fator de necrose tumoral β1 (TNF-β1)* (BOCCI et al., 2009).

Na medicina humana, o emprego da lavagem uterina com solução salina ozonizada em mulheres demonstrou vários efeitos favoráveis na perfusão sanguínea e outros parâmetros histológicos endometriais (CALDERON et al., 2016). Esta relação pode ser explicada considerando-se o maior aporte de oxigênio e melhoria do metabolismo geral (BORRELLI, 2002), pela ativação do sistema imune e estimulação da secreção de fatores de crescimento diversos (BOCCI et al., 2009). Também descrito recentemente em equinos, o preenchimento da cavidade uterina com O<sub>3</sub> é capaz de aumentar a proliferação celular e a perfusão sanguínea uterina, sem apresentar efeitos colaterais (CAMARGO FERREIRA et al., 2021). Contudo, após pesquisa nas principais bases de dados, não foram encontradas pesquisas pertinentes na literatura científica que tenham analisado alterações na perfusão sanguínea da ozonioterapia intrauterina em bovinos.

Nesse sentido, a ultrassonografia modo Doppler, amplamente descrita na literatura científica, detém de potencial para analisar alterações na perfusão vascular em diversos tecidos, como alterações na perfusão sanguínea uterino em bovinos, apresentando elevada reprodutibilidade (BOLLWEIN; BAUMGARTNER; STOLLA, 2002). Contudo, as pesquisas usualmente avaliam a vascularização uterina somente pela análise de perfusão sanguínea na

artéria uterina média (Debertolis et al., 2016; Sharawy et al., 2022; Sharma et al., 2021). Portanto, este estudo propõe implementar a terapia intrauterina com solução ozonizada com objetivo de avaliar efeitos da ozonioterapia sobre a perfusão sanguínea uterina em vacas saudáveis, sem endometrite clínica ou subclínica, testando a segurança e viabilidade da utilização desta alternativa terapêutica. A pesquisa é baseada na análise de alterações da perfusão sanguínea uterina acessada pela ultrassonografia modo-Doppler empregada nos cornos uterinos.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Ambiente uterino**

O útero é considerado o local de fixação do conceito, em que passa por diversas alterações durante o ciclo estral e a gestação. A parede uterina é dividida em três camadas, considerando a mais interna como o endométrio, que reveste o lúmen uterino; seguida pelo miométrio que representa a camada muscular e recoberto por uma membrana serosa, denominada de perimétrio, composta por células musculares lisas com continuação com o ligamento largo do útero. Na camada endometrial, a classificação histológica compreende epitélio colunar pseudoestratificado com a presença de glândulas tubulares (Eurell e Frappier, 2006).

No período pós-parto, algumas vacas desenvolvem doenças uterinas pós-parto (SHELDON, 2004), considerando-se que os mecanismos de defesa do útero são influenciados por diversas características, como estado imunológico do organismo, espécie e virulência dos microrganismos patogênicos e da carga de contaminação do lúmen uterino (SHELDON et al., 2006). Em casos de infecção e lesão tecidual, uma das principais respostas do sistema imune inato é a secreção de citocinas pelas células teciduais, desencadeando uma resposta inflamatória aguda. As citocinas apresentam propriedades relevantes no processo inflamatório, visto que citocinas diferentes têm ações similares ou sobrepostas, estimulando a produção de outras e estabelecendo cascatas que amplificam a reação ou induzem novas reações (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A redução na ingestão de matéria seca está associada ao aumento nas concentrações circulantes de ácidos graxos não esterificados (NEFA), que contribuem para a ocorrência de lipidose hepática, associada à função prejudicada dos neutrófilos (LEBLANC; OSAWA; DUBUC, 2011). Além do balanço energético negativo (BEN) pós-parto, esse processo ocorre

devido ao grau de inflamação associado ao parto, expulsão da placenta e involução uterina. O BEN associado ao nível de trauma e contaminação bacteriana do útero, além da mobilização de gordura e liberação de NEFA, que resultam na liberação de *fator de necrose tumoral  $\alpha$*  (*TNF- $\alpha$* ) e *interleucina 6* (*IL-6*). Diante disso, as citocinas pró-inflamatórias (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* ) estimulam a produção de proteínas de fase aguda (APP) pelo fígado, como a haptoglobina (Hp). Ocorre também captação de NEFA pelos hepatócitos e produção de  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB). Assim, níveis elevados de NEFA, BHB, Hp ou redução em concentrações de glicose ou cálcio podem prejudicar ou desregular a função dos neutrófilos no útero (Pascottini and LeBlanc, 2020).

Alterações no ambiente uterino de fêmeas com maior presença de PMN diagnosticadas com endometrite subclínica ou citológica, normalmente podem ser correlacionadas a alterações moleculares, como elevação na expressão de mRNA endometrial de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, peptídeos antimicrobianos, APP e prostaglandinas. Além de citocinas que normalmente se apresentam reguladas positivamente (*upregulated*), incluindo mRNA de *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *TNF- $\alpha$*  (FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2009).

O recrutamento e a função de neutrófilos direcionados para o útero são altamente relevantes nos dias subsequentes ao parto para a eliminação de bactérias e lóquio e, conseqüentemente, para a prevenção de endometrite (CHAPWANYA et al., 2009). Porém, estes autores também demonstraram que o aumento excessivo do estado inflamatório nas primeiras semanas pós-parto está associado ao maior risco de endometrite. Ocorrem alterações no ambiente uterino, com maior expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (*IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* ) e seus receptores (*IL-1R2*) e *Toll-like receptor 4* (*TLR4*), que constituem na primeira linha de defesa contra patógenos invasores ou moléculas endógenas liberadas por células e tecidos danificados (HERATH et al., 2009).

## 2.2 Afecções uterinas

Existe uma divergência relacionada à terminologia empregada na avaliação da saúde uterina, em que devido a variação da avaliação vaginal e análise citológica, alguns autores sugerem o emprego de termos como descarga vaginal purulenta e endometrite citológica, ao invés de endometrite clínica e subclínica (DUBUC et al., 2010). Estas alterações são justificadas pela classificação da doença com base em sinais clínicos e técnicas de diagnóstico. De acordo com Wagener et al. (2017), alterações no ambiente uterino podem ser analisadas por esfregaços de células endometriais, caracterizando-se como um método confiável e que pode ser

reproduzido e aplicado. Segundo Barlund et al. (2008), a citologia é a técnica mais eficaz para diagnosticar endometrite, quando comparada a ultrassonografia, vaginoscopia e palpação retal.

O aperfeiçoamento de métodos de diagnóstico e controle das doenças uterinas em bovinos é de extrema relevância para a produção animal. Além de prejudicar a saúde e reduzir o consumo de alimento e produção de leite, essas doenças causam consequências econômicas relacionadas a queda no desempenho reprodutivo, descarte de animais e redução na lucratividade das fazendas leiteiras (BICALHO et al., 2010).

Existem diversas alternativas terapêuticas que podem ser empregadas no tratamento de doenças uterinas, incluindo antibioticoterapia sistêmica, associada a administração de anti-inflamatórios ou hormônios. Também há algumas discussões na literatura relacionadas a eficiência do tratamento de endometrite subclínica, podendo ser realizado com infusão uterina com fármacos à base de cefapirina associados a administração sistêmica de prostaglandina F2- $\alpha$  (PGF 2- $\alpha$ ) (WAGENER; GABLER; DRILLICH, 2017). Além de infusão com oxitetraciclina. Embora a oxitetraciclina seja amplamente utilizada por veterinários no tratamento de infecções uterinas, há evidências de resistência bacteriana a este antimicrobiano (SHELDON, 2004). Além do mais, existe a preocupação de muitos órgãos reguladores de saúde animal relacionada ao uso responsável de agentes antimicrobianos em animais destinados à produção de alimentos para consumo humano.

### **2.3 Citologia endometrial**

A citologia endometrial pode ser considerada um método comumente aplicado na obtenção de amostras do endométrio uterino de bovinos, podendo realizar as coletas nos cornos uterinos ou no corpo do útero (KASIMANICKAM et al., 2004; KAUFMANN et al., 2009; MADDOZ et al., 2013). Essa técnica inicialmente foi empregada na medicina humana para auxiliar no diagnóstico de câncer cervical em mulheres, e depois foi alterada para utilização na clínica veterinária (WAGENER; GABLER; DRILLICH, 2017)

A utilização da citologia endometrial para diagnosticar alterações celulares decorrentes de endometrite subclínica em bovinos foi descrita inicialmente por Kasimanickam et al. (2004). Estes autores utilizaram valores limites na contagem de PMN  $\geq 18\%$  para vacas entre 20 e 33 dias em lactação e PMN  $\geq 10\%$  para vacas entre 34 e 37 dias em lactação. Dubuc et al. (2010) propuseram limites para diagnóstico de endometrite citológica de acordo com tempo pós-parto das fêmeas, utilizando PMN  $\geq 6\%$  entre 32-38 dias pós-parto (dpp) e PMN  $\geq 4\%$  entre 53 e 59 dpp. Esses autores também demonstraram que a contagem de PMN reduz no decorrer do período pós-parto, em concordância com Madoz et al. (2013).

Segundo Kaufmann et al. (2009), a técnica de citologia endometrial é considerada minimamente invasiva, e não apresenta impacto negativo no posterior desempenho reprodutivo dos animais. Além disso, o processo de citologia é menos traumático que o processo de biópsia endometrial (Cardoso et al., 2017), visto que múltiplas biópsias no mesmo animal podem desencadear um processo inflamatório local e afetar o tecido endometrial e o desempenho reprodutivo subsequente da fêmea (Zaayer e Van Der Horst, 1986). Segundo Cardoso et al. (2017), normalmente na análise de células endometriais, as amostras obtidas por biópsia apresentam maior quantidade de células estromais e endoteliais, enquanto as amostras coletadas por citologia apresentam mais células imunes e epiteliais, direcionando a técnica baseada na finalidade da análise.

A contagem de PMN determinada pela citologia endometrial não apresenta variação significativa ao longo do ciclo estral em bovinos. Considerando a hipótese de que a alteração de PMN relacionada ao estro estaria mais marcante em camadas profundas do endométrio, e que a escova citológica coleta somente células presentes em camadas superficiais endometriais (Bogado Pascottini et al., 2016; Madoz et al., 2013). A técnica de avaliação por meio de citologia endometrial ainda não é comumente empregada na rotina reprodutiva de fazendas, porém poderia ser incluída como ferramenta de avaliação/monitoramento de rebanhos com problemas de fertilidade.

Melcher et al. (2014) compararam as técnicas de avaliação de lâminas após a citologia uterina, por meio da contagem de 100, 300 e 500 células totais ou pelo estabelecimento de dez campos aleatórios para triagem e determinação de PMN em cada lâmina. Os autores recomendaram a contagem de 300 células por lâmina para determinar a proporção de PMN e análise de saúde uterina. Além disso, a contagem de 100 células ou somente a triagem de PMN podem superestimar ou subestimar a prevalência de endometrite subclínica, considerando o limite de 5% a 6% de PMN. Estas informações estão em concordância com Kasimanickam et al. (2004), Kasimanickam et al. (2005), Madoz et al. (2013) e Santos et al. (2009).

## **2.4 Ultrassonografia aplicada à reprodução de bovinos**

A evolução da tecnologia relacionada ao diagnóstico por imagem, especialmente a análise ultrassonográfica impactou diretamente as pesquisas na medicina veterinária. A ultrassonografia convencional em modo B (modo de brilho) inicialmente foi descrita na reprodução de bovinos em meados de 1980. Com isso, a obtenção de imagens bidimensionais em escala de cinza permitiu o entendimento de diversos aspectos da biologia reprodutiva animal.

O funcionamento e formação da imagem ultrassonográfica em modo B, se fundamenta na emissão de ondas sonoras por um transdutor. Essas ondas penetram nos tecidos e são refletidas de volta para o transdutor em frequências variadas, conforme a densidade dos tecidos. Assim, o aparelho de ultrassom processa essas informações e gera uma imagem em escala de cinza (Fontes e Oosthuizen, 2022).

A aplicação da ultrassonografia se tornou fundamental em diversas pesquisas relacionadas à reprodução de bovinos, incluindo comparações de dinâmica e seleção folicular entre fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*; trabalhos envolvendo análises morfológicas de corpos lúteos incluindo aspectos de tamanho, ecogenicidade e alterações funcionais e estruturais. Além da inclusão em diversas pesquisas envolvendo aparência e ecotextura do útero em fases distintas do ciclo estral; acompanhamento constante do desenvolvimento do concepto e fatores relacionados a perda embrionária e fetal. E em pesquisas relacionadas a inflamação e involução uterina pós-parto e retorno de função ovariana (Ginther, 2014). Sendo amplamente disseminada e em constante aperfeiçoamento, esta biotecnologia auxilia diversos exames do trato reprodutivo, como o diagnóstico de patologias reprodutivas, confirmação de gestação, viabilidade e sexagem fetal, acompanhamento da dinâmica ovariana durante o ciclo estral e acompanhamento gestacional e do desenvolvimento embrionário e também em casos de superovulação (Ginther, 2014).

## **2.5 Ultrassonografia modo Doppler**

Segundo Ginther e Utt (2004), a ultrassonografia permite estimar o fluxo e perfusão sanguínea, auxiliando para indicar a funcionalidade das estruturas e órgãos reprodutivos. Essa biotecnologia é baseada na identificação de mudanças na frequência das ondas sonoras enviadas pelo transdutor e refletidas pelos glóbulos vermelhos, que estão constantemente mudando de posição em relação ao transdutor. Assim, a frequência das ondas de ultrassom refletidas quando os glóbulos vermelhos se movem em direção ao transdutor, é maior do que a frequência das ondas emitidas, resultando em desvio Doppler positivo. E o mesmo ocorre quando os glóbulos vermelhos se afastam do transdutor, com desvio doppler negativo.

A ultrassonografia doppler detêm de três modos principais que podem ser utilizados, sendo: Doppler espectral, *power Doppler* e *color Doppler*/Doppler colorido. No modo doppler colorido, o desvio doppler também pode ser visualizado como os sinais de cor que são sobrepostos à imagem convencional em modo B, indicando vascularização da estrutura analisada e direção do fluxo sanguíneo. Normalmente, as cores que variam desde o amarelo ao vermelho indicam frequências mais altas, e cores entre verde ao azul indicam frequências

relativas mais baixas. Porém, este formato pode ser alterado de acordo com as configurações de cada aparelho de ultrassom (Ginther; Utt, 2004).

A avaliação ultrassonográfica em modo-Doppler colorido é uma ferramenta não invasiva capaz de avaliar variações no fluxo sanguíneo ao longo ciclo estral das fêmeas (Bollwein et al., 2002). Apresenta diversas aplicações relacionadas a avaliação do sistema reprodutivo, como avaliação da vascularização de folículos ovarianos, corpo lúteo, útero e vagina (Sharawy et al., 2022). Além de alterações durante o período gestacional (Bollwein et al., 2002) e aplicações no diagnóstico precoce de fêmeas não gestantes associado a vascularização de corpo lúteo discutido especialmente em bovinos (Guimarães et al., 2015; Palhão et al., 2020) e em pequenos ruminantes (Rizzoni et al., 2024).

A ultrassonografia Doppler tem sido uma biotecnologia da reprodução animal com potencial de aplicação em pesquisas que buscam quantificar o fluxo uterino durante o desencadeamento do período gestacional. Essa técnica possibilita realizar inferências sobre adequações de manejo que podem afetar o desenvolvimento do feto e os resultados de prenhes (Fontes; Oosthuizen, 2022). Os trabalhos são baseados no aumento do fluxo sanguíneo para o trato reprodutivo necessário para suportar a troca de nutrientes e resíduos entre as circulações materna e fetal durante o período de gestação, diretamente relacionada ao fluxo sanguíneo placentário (Bollwein et al., 2002).

A vascularização uterina também pode ser influenciada pela diferença na fase do ciclo estral em que as fêmeas se encontram. Segundo Dzięcioł et al. (2015), fêmeas no estro apresentam maior vascularização uterina em comparação com fêmeas na fase de metaestro. Outros autores descrevem informações semelhantes, considerando maior fluxo sanguíneo durante o proestro e estro e redução de vascularização durante o diestro (Honnens et al., 2008).

A maioria dos trabalhos presentes na literatura, avaliaram a vascularização uterina somente pela análise de perfusão sanguínea na artéria uterina média (Debertolis et al., 2016; Sharawy et al., 2022; Sharma et al., 2021). Até onde sabemos, não foram encontradas pesquisas na literatura científica que tenham analisado alterações na perfusão sanguínea da ozonioterapia intrauterina em bovinos. Somente alguns autores avaliaram a vascularização uterina diretamente pelo exame em modo Doppler dos cornos uterinos, como no caso de Dzięcioł et al. (2015), porém, foram avaliadas alterações vasculares causadas pela administração intravaginal de outras substâncias.

Contudo, na medicina humana, Calderon et al. (2016) avaliaram o efeito da irrigação com solução salina estéril ozonizada em parâmetros histológicos e celulares no endométrio de mulheres saudáveis. A pesquisa resultou em efeitos positivos relacionados a elevação na altura

do epitélio celular colunar, aumento do número de vasos sanguíneos endometriais e aumento no número de células estromais. Corroborando com resultados descritos recentemente em equinos, por Camargo Ferreira et al. (2021), analisando mudanças no perfil de vascularização no útero após o preenchimento da cavidade uterina com O<sub>3</sub> em diferentes concentrações. Foram verificados diversos efeitos favoráveis nos parâmetros vasculares endometriais, como aumento no número de vasos sanguíneos endometriais, e no grau de vascularização uterina.

## 2.6 Ozonioterapia

A aplicação da ozonioterapia é diversa e está cada vez mais presente nas pesquisas científicas na medicina humana. O gás ozônio (O<sub>3</sub>) é um gás instável que apresenta tempo de meia vida próximo a 40 minutos em temperatura ambiente, podendo desencadear a síntese de espécies reativas presentes em diversas vias de sinalização celular (Camargo Ferreira et al., 2021). O O<sub>3</sub> é tóxico na troposfera durante inalação crônica do ar. Porém, em doses controladas apresenta resultados benéficos no tratamento de doenças vasculares em humanos, como isquemia crônica e acidentes vasculares cerebrais, além de aplicações nas áreas de ortopedia e odontologia (Bocci et al., 2011).

O O<sub>3</sub> tem potencial de ativação do sistema imune e estimulação da secreção de fatores de crescimento diversos (Bocci et al., 2009). O O<sub>3</sub> pode atuar como um imunomodulador no organismo (Korzun et al., 2008), estimulando a ativação de linfócitos ou monócitos para liberar várias citocinas, como *interferon α, β, γ, TNF-α, interleucinas 1, 2, 4, 6, 8 e 10, fator estimulante de colônia de granulócitos/monócitos (GM-CSF) e fator de transformação de crescimento β (TGF-β)* (Ohtsuka et al., 2006). Algumas destas substâncias apresentam diversas funções locais e sistêmicas, como a ação de *TNF, IL-1, IL-6* e quimiocinas, produzidas em sítios inflamatórios e que possuem diversos efeitos sobre as células endoteliais vasculares, leucócitos e medula óssea. Estas, intensificam a produção de neutrófilos em ação conjunta com fatores estimuladores de colônias e realizando a reposição de leucócitos consumidos durante as reações inflamatórias (Abbas et al., 2019).

Dessa forma, o O<sub>3</sub> em concentrações reduzidas atua como estressor terapêutico no organismo (Bocci et al., 2011), permitindo maior oxigenação para o tecido e melhoria do metabolismo geral (Borrelli, 2002). A aplicação em forma de gás ou dissolvido em água pura pode ser um excelente desinfetante para infecções cutâneas e mucosas (Bocci et al., 2011). As bactérias Gram-positivas apresentam maior sensibilidade ao O<sub>3</sub> em comparação as Gram-negativas (Samardžija et al., 2017).

Na medicina veterinária, existem diversas pesquisas ao longo dos anos descrevendo aplicações da ozonioterapia (Bocci et al., 2009; Camargo Ferreira et al., 2021; Durrani, 2017; Scrollavezza et al., 1997; Travagli et al., 2009), porém a utilização desta ferramenta terapêutica ainda é incipiente e está relacionada somente a algumas áreas específicas da clínica médica (Đuričić et al., 2015). O O<sub>3</sub> Especialmente auxilia no tratamento de diversas afecções, como mastite, metrite, endometrite, retenção de membranas fetais, vaginite, urovagina, enterite e laminite, além de diversas lesões e distúrbios neuromusculares (Đuričić et al., 2014; 2015; Zobel et al., 2014). Também existem descrições de utilização como analgésico quando aplicado no pós-operatório de cirurgia de ovariosalpingohisterectomia em cadelas (Teixeira et al., 2013).

Em um estudo desenvolvido por Escandón et al. (2020), a infusão intrauterina com solução com água esterilizada ozonizada em 80 vacas de leite foi avaliada e a relação com a prevalência de endometrite subclínica no pós-parto e desempenho reprodutivo dos animais foi descrita. A contagem de PMN foi analisada por meio de citologia uterina antes e 72h após a ozonioterapia. Os autores demonstraram um decréscimo de  $7.6 \pm 1.1\%$  para  $3.7 \pm 1.4$  na contagem de PMN e de 50,0% para 5,0% na ocorrência de endometrite subclínica. Além disso, o tratamento com ozonioterapia intrauterina resultou em redução do número de serviços por concepção e aumento na taxa de concepção ao primeiro serviço, quando avaliadas as vacas tratadas em comparação ao grupo controle.

Constantin e Bîrțoiu (2016) também avaliaram a influência da ozonioterapia no desempenho reprodutivo de bovinos. Ao comparar vacas clinicamente híginas e vacas diagnosticadas com doença uterina sete a dez dias pós-parto, os autores observaram melhorias relacionadas a reprodução destes animais, como aumento na taxa de concepção ao primeiro serviço. Estes resultados corroboram com observações de Đuričić et al. (2014), que também avaliaram o emprego da terapia com espuma de ozônio intrauterina em vacas com metrite e endometrite e descreveram redução do número de dias em aberto e do intervalo do parto à primeira inseminação.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Avaliar alterações na perfusão sanguínea uterina promovidas pela ozonioterapia intrauterina em bovinos hígdos, verificando a segurança e viabilidade da utilização desta alternativa terapêutica.

#### Objetivos Específicos

- Avaliar alterações no perfil de vascularização uterina por meio de ultrassonografia modo-Doppler de cada corno uterino após terapia de infusão com solução fisiológica ozonizada realizada em vacas saudáveis;
- Analisar a concentração de neutrófilos polimorfonucleares no endométrio a fim de constatar a saúde uterina e ausência de endometrite citológica dos animais avaliados.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras com protocolo 025/23.

#### 4.1 Animais

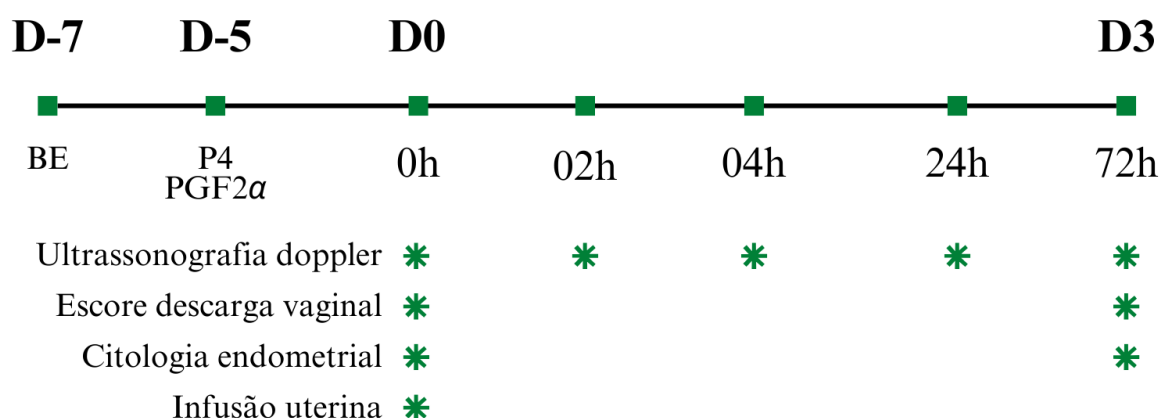
O projeto foi desenvolvido no rebanho bovino experimental do Departamento de Zootecnia. Foram incluídas fêmeas da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*), nulíparas ou múltíparas, mantidas em pastejo (*Urochloa brizantha*), com acesso a água e suplementação mineral. Todos os animais estavam clinicamente hígdos (média de  $4,5 \pm 1,8$  anos;  $485,0 \pm 94,2$  Kg de peso vivo e Escore de Condição Corporal  $6,2 \pm 0,82$  em escala de 1-10).

#### 4.2 Delineamento experimental

O design experimental *crossover* (Figura 1) consistiu-se em dois períodos experimentais que foram separados em duas etapas: etapa de sincronização (D-7 a D0) e etapa de coleta de amostras (D0 a D3). Na etapa de sincronização, todas as vacas foram incluídas em um protocolo hormonal (D-7) que consistia em uma aplicação intramuscular (IM) de 2,0mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ouro Fino®) e (D-5) aplicação IM de 150,0mg de progesterona (Sincrogest Injetável, Ouro Fino®) e 0,50mg de cloprostenol sódico (Sincrocio, Ouro Fino®). Esse procedimento teve a finalidade de sincronizar o ciclo estral para que as fêmeas iniciassem as coletas experimentais na fase luteal/progesterônica do ciclo, sem a presença de corpo lúteo

nos ovários. Na etapa de coleta de amostras, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, considerando paridade (nulíparas versus múltíparas) e condição ovariana no início do protocolo de sincronização (fêmeas cíclicas versus fêmeas em anestro). Formando-se o grupo controle (n=5) que recebeu uma infusão uterina com solução fisiológica; e grupo tratamento uterino (n=6) que recebeu uma infusão uterina com solução fisiológica ozonizada. Após o término do primeiro período experimental, as fêmeas foram novamente sincronizadas e avaliadas para serem incluídas no mesmo procedimento experimental, no entanto, invertendo os tratamentos. Animais do grupo controle no primeiro período experimental, formaram o grupo tratamento uterino no segundo período. Assim, a amostra final em cada grupo (tratamento ou controle) foi constituída por 11 animais. Esse manejo caracteriza o design experimental em *crossover*.

Figura 1 – Delineamento Experimental



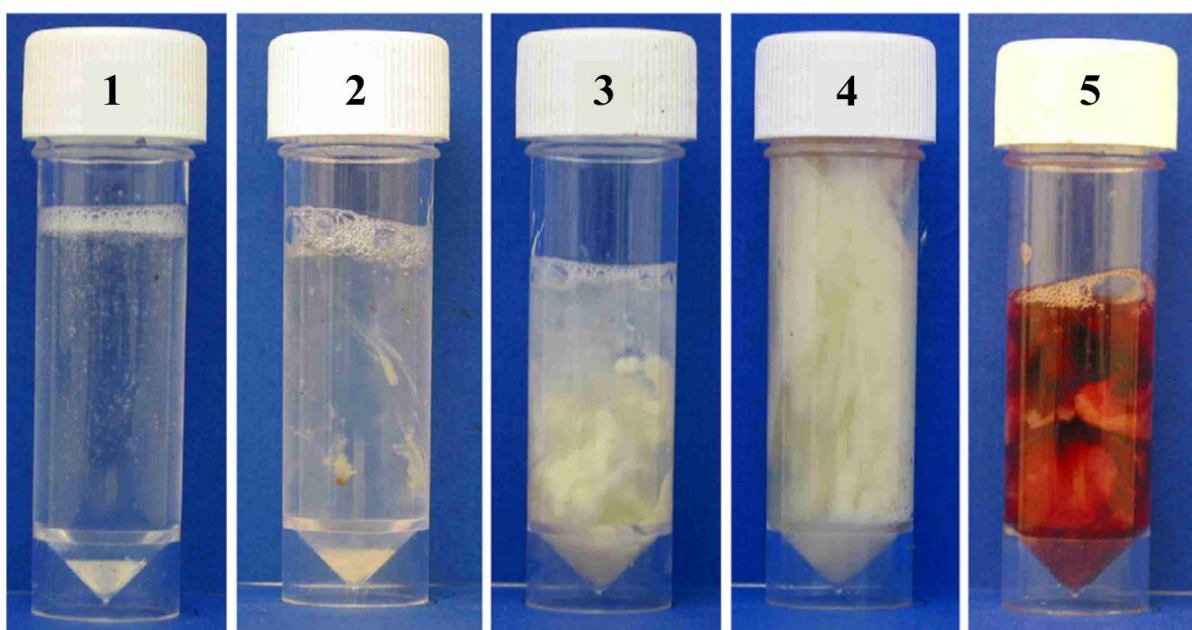
Legenda: As vacas (n=11) foram incluídas em modelo experimental crossover, separadas em grupo controle (n=5) que recebeu uma infusão uterina com solução fisiológica; e grupo tratamento (n=6) que recebeu uma infusão uterina com solução fisiológica ozonizada. Na etapa de sincronização (D-7 a D0), foi realizada aplicação de benzoato de estradiol (BE; D-7) e progesterona (P4) e cloprostenol sódico (D-5), em todos os animais. Após a divisão dos grupos, se iniciou a etapa de coleta de amostras. Considerando o horário da infusão uterina (0h), foi realizada caracterização do escore de descarga vaginal (EDV) em 0h e 72h; e avaliações ultrassonográficas modo-Doppler para verificação de vascularização uterina às 0h, 02h, 04h, 24h e 72h após a infusão uterina. Além disso, foi feita citologia endometrial para contagem de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) em dois momentos: 0h e aproximadamente 72h após a infusão. Após o término do primeiro período experimental, as fêmeas foram sincronizadas e ressubmetidas ao protocolo, invertendo o tratamento recebido.

### 4.3 Avaliação de descarga vaginal

No início da etapa de coleta de amostras (D0), previamente à infusão uterina (0h), foi realizada avaliação do escore de descarga vaginal (EDV) usando dispositivo *Metricheck* (Walmur®), previamente desinfetado com solução de água e cloreto de alquil dimetil benzil amônio. Foi feita limpeza prévia da vulva com papel toalha. O EDV foi caracterizado de 1 a 5

(Figura 2): EDV1 = presença de muco claro ou translúcido não fétido, EDV2 = presença de muco turvo com manchas de pus não fétido, EDV3 = secreção mucopurulenta <50% de pus e não fétido, EDV4 = secreção mucopurulenta branca, amarela ou marrom-avermelhada  $\geq$ 50% de pus e não fétido e EDV5 = presença de muco fino, seroso ou aquoso, castanho-avermelhado, com ou sem partes de tecido necrótico e fétido (Machado et al., 2020). Essa verificação de EDV foi realizada novamente após 72h a fim de verificar alterações clínicas e visuais que poderiam ser causadas por processo inflamatório/infeccioso do tecido endometrial ou vaginal.

Figura 2 – Caracterização de escore de descarga vaginal

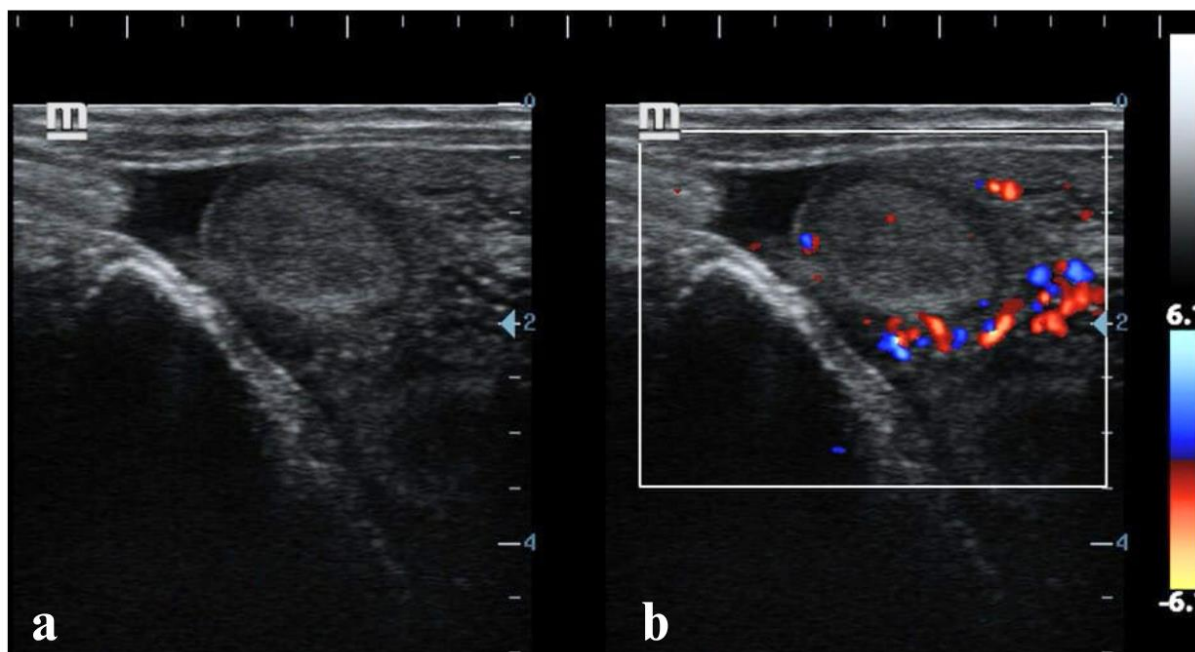


Legenda: Caracterização de escore de descarga vaginal (EDV) em escala de 1 a 5: EDV1 = presença de muco claro ou translúcido não fétido, EDV2 = presença de muco turvo com manchas de pus não fétido, EDV3 = secreção mucopurulenta <50% de pus e não fétido, EDV4 = secreção mucopurulenta branca, amarela ou marrom-avermelhada  $\geq$ 50% de pus e não fétido e EDV5 = presença de muco fino, seroso ou aquoso, castanho-avermelhado, com ou sem partes de tecido necrótico e fétido (Machado et al., 2020). Fonte: adaptado de Sheldon et al. (2006).

#### 4.4 Avaliação de vascularização uterina

Foi realizada ultrassonografia reprodutiva para verificação de vascularização uterina utilizando aparelho de ultrassom veterinário (Mindray®), modelo Z-50 VET acoplado a um transdutor retal, 7,5MHz. O exame ultrassonográfico em modo-Doppler, realizado por um único médico veterinário treinado, consistiu na avaliação do perfil de perfusão vascular em ambos os cornos uterinos, após padronização do local de avaliação (porção dorsocranial da curvatura uterina em cada corno uterino) e obtenção de vídeos em modo B e modo-Doppler (Figura 3).

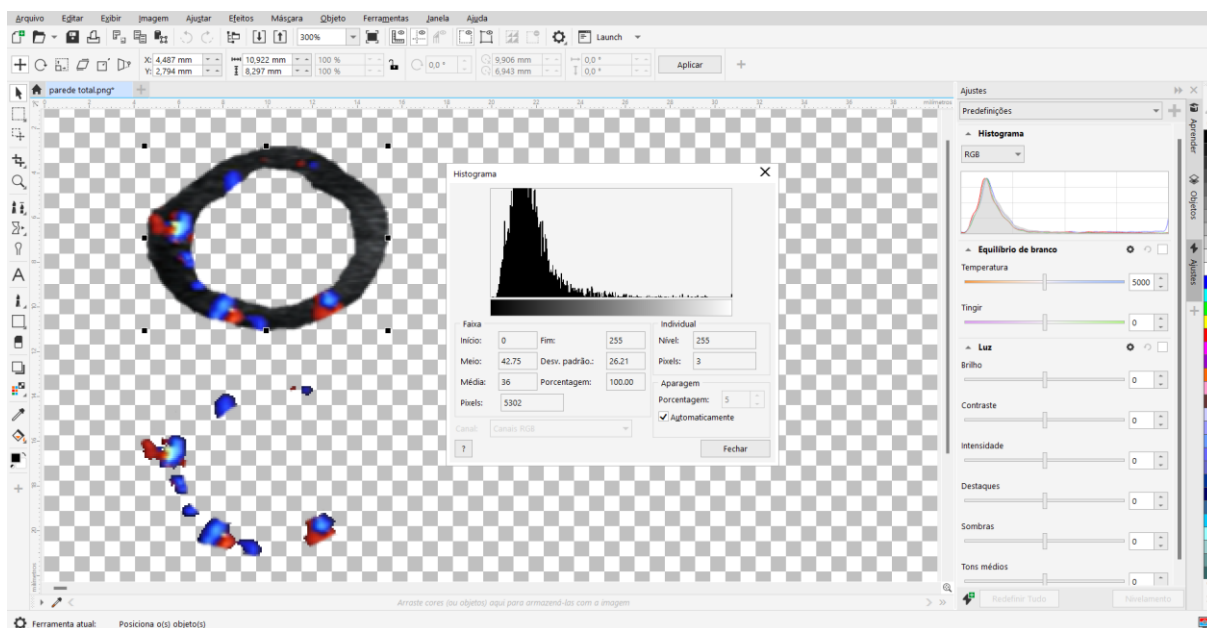
Figura 3 – Imagem ultrassonográfica para avaliação de vascularização uterina



Legenda: Imagem ultrassonográfica em modo B (a) e modo-Doppler (b) da porção dorsocranial da curvatura uterina. A imagem de cada corno uterino foi obtida para verificação do número de pixels coloridos analisada pelo Software Corel Photo-paint.

Na análise de cada vídeo ultrassonográfico, um único avaliador sem informações referentes ao histórico das vacas, selecionou uma imagem para contagem de pixels coloridos e totais, a fim de verificar a porcentagem de pixels coloridos realizada em análise pelo Software Corel Photo-paint®. Em cada vídeo ultrassonográfico, foi selecionado um único frame que demonstrasse o melhor perfil de vascularização uterina. Os resultados da contagem de pixels coloridos e totais foram obtidos por meio de histogramas confeccionados automaticamente pelo *software* após processamento individual de cada imagem (Figura 4), seguindo o padrão de processamento de imagem e contagem de pixels. Foi obtida a média da porcentagem de pixels coloridos por animal. Este exame ultrassonográfico visou avaliar o perfil de vascularização uterina imediatamente após infusão de solução ozonizada para verificar possíveis alterações vasculares locais causadas pela ozonioterapia. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas previamente à infusão uterina com soro ozonizado (0h) e aproximadamente 02h, 04h, 24h e 72h após a infusão uterina.

Figura 4 – Análise da imagem ultrassonográfica para contagem de pixels coloridos e totais



Legenda: foi selecionada uma imagem ultrassonográfica individual de cada corno uterino e realizada a seleção da porção endometrial pelo Software Corel Photo-paint. Os resultados foram obtidos por meio de histogramas confeccionados pelo software após processamento de cada imagem para contagem de pixels coloridos e totais, a fim de verificar a porcentagem de pixels coloridos.

#### 4.5 Citologia endometrial

As amostras endometriais para contagem de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) foram obtidas por citologia uterina em dois momentos: 0h e aproximadamente 72h após a infusão, como descrito por Escandón et al. (2020). A montagem do equipamento foi semelhante a técnica previamente descrita por Dadarwal et al. (2019), em que uma escova cervical humana foi acoplada em um aplicador para inseminação artificial em bovinos (Figura 5). Porém, houve algumas modificações, como a montagem do equipamento (previamente autoclavado), realizada em capela de exaustão de gases em laboratório previamente higienizado. O equipamento foi recoberto por balsa de inseminação artificial e camisa sanitária, a fim de evitar quaisquer contaminações celulares ou com demais materiais biológicos. A camisa sanitária foi rompida na entrada do cérvix e ao adentrar o útero, a escova ginecológica foi exposta na porção do corpo uterino e a coleta de material baseada em cinco giros da escova em sentido horário e cinco giros em sentido anti-horário a fim de coletar amostra endometrial. Após realização do procedimento, a escova foi recolhida novamente para o interior do aplicador, que era retirado do animal em seguida, a fim de evitar contaminações com células vaginais ou demais matérias biológicos.

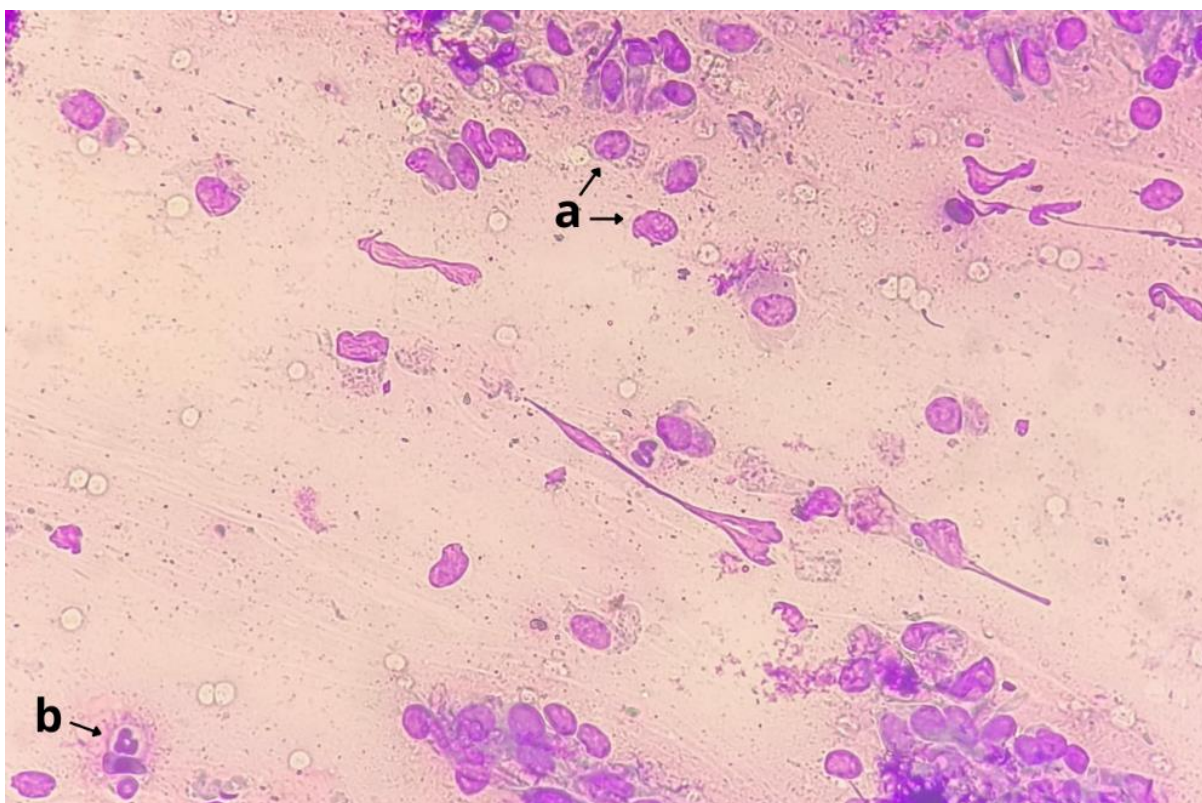
Figura 5 – Montagem do equipamento utilizado para citologia endometrial bovina



Legenda: para a montagem do equipamento para citologia endometrial, uma escova cervical humana foi acoplada em um aplicador para inseminação artificial em bovinos (a, b), previamente autoclavado. O equipamento foi recoberto por bainha de inseminação artificial e camisa sanitária (c), a fim de evitar quaisquer contaminações celulares ou com demais materiais biológicos. Todo o processo foi realizado em capela de exaustão de gases em laboratório previamente higienizado e foi utilizado um aplicador individual por animal.

Cada amostra individual coletada na citologia endometrial foi fixada em lâmina de vidro e corada por meio de panótico rápido (Kit Instant Prov®) para preservação de morfologia celular e posterior contagem de neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Na avaliação microscópica das lâminas (ampliação de 400x), a concentração de PMN foi analisada por um único avaliador sem informações referentes a origem das lâminas e status das vacas. Em cada lâmina, foram contabilizadas pelo menos 300 células epiteliais endometriais e usadas para calcular a proporção de PMN na amostra (Figura 6), de acordo com a fórmula:  $[(\text{células PMN}) / (\text{PMN} + \text{células epiteliais})]$ , descrita por Druker et al. (2022). Células sanguíneas vermelhas e outros leucócitos também foram visualizados, porém não foram incluídos na análise. Animais apresentando endometrite subclínica podem ser classificados com concentração de PMN acima de 6% em relação as células epiteliais endometriais. Este valor é sugerido para fêmeas de baixa de produção e mantidas em sistema de pastejo (Madoz et al., 2013).

Figura 6 – Avaliação microscópica de lâminas de citologia endometrial bovina



Legenda: Em cada lâmina individual de citologia endometrial, foram contabilizadas pelo menos 300 células epiteliais endometriais (a) e usadas para calcular a proporção de neutrófilos polimorfonucleares (b) na amostra, de acordo com a fórmula: [(células PMN)/ (PMN + células epiteliais)]. As lâminas foram coradas por meio de panótico rápido (Kit Instant Prov®) e analisadas em ampliação de 400x.

#### 4.6 Infusão uterina com solução ozonizada

Em cada período experimental, todas as vacas receberam uma infusão uterina com 50 mL de solução fisiológica (grupo controle) ou solução fisiológica ozonizada (grupo tratamento uterino), seguindo a concentração de 50 µg/mL, descrita por Escandón et al. (2020). A solução foi preparada após a insuflação de ozônio em bolsa contendo 80 mL de solução fisiológica durante 10min. Foi utilizado equipamento gerador de ozônio (ZVet, Ozonebras®) acoplado a um cilindro de oxigênio e um regulador de vazão calibrado para manter a concentração de ozônio (O<sub>3</sub>) em 50 µg/mL de solução fisiológica (Figura 7). Uma dose única de 50 mL desta solução ozonizada foi aplicada no lúmen uterino por infusão com uma seringa de 60 mL acoplada a pipeta descartável (64 cm de comprimento, diâmetro interno de 5 mm), utilizada para inseminação artificial em equinos. Por fim, foi realizada massagem uterina transretal para favorecer a distribuição da solução no lúmen uterino.

Figura 7 – Equipamento gerador de ozônio



Legenda: equipamento gerador de ozônio (ZVet, Ozonebras®) acoplado a um cilindro de oxigênio e um regulador de vazão calibrado para manter a concentração de ozônio ( $O_3$ ) em  $50\mu\text{g/mL}$  de solução fisiológica. A solução ozonizada foi preparada individualmente após a insuflação de ozônio em bolsa contendo 80 mL de solução fisiológica durante 10 min. A infusão uterina foi realizada logo após finalizar o processo de insuflação.

#### 4.7 Análise Estatística

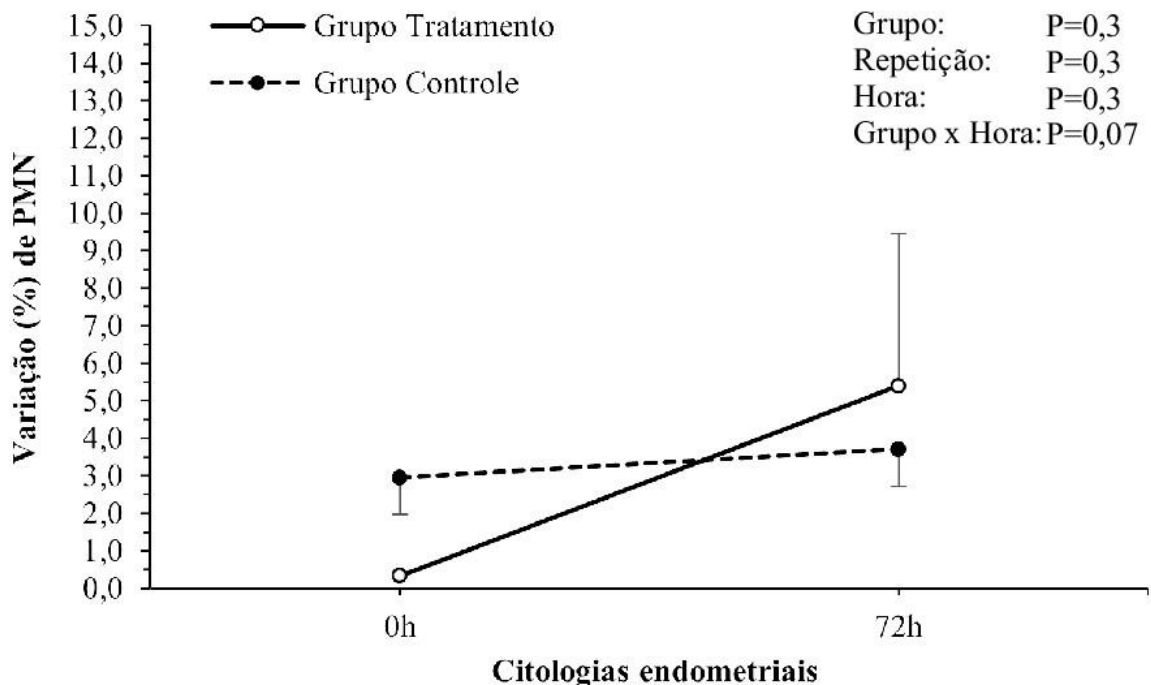
Os dados de vascularização uterina foram obtidos por meio de porcentagem de vascularização em cada exame ultrassonográfico e transformados para logaritmos naturais para serem avaliados. O modelo contendo efeito de grupo (tratamento ou controle), horas (0h, 2h, 4h, 24h e 72h), repetição dos animais e interação (grupo x hora) foi analisado utilizando o procedimento estatístico PROC MIXED do SAS. A variável relacionada a contagem de neutrófilos polimorfonucleares na citologia endometrial foi testada pelo procedimento PROC GLIMMIX com distribuição multinomial. Neste modelo foi analisado efeito de grupo

(tratamento ou controle), hora (0h e 72h), repetição dos animais e interação (grupo x hora). Por fim, na avaliação de escore de descarga vaginal, foi utilizado modelo estatístico com distribuição de frequência dos animais em cada escore (1-5), em cada um dos momentos avaliados (0h e 72h). Foi empregado o teste exato de Fischer para comparar as frequências de distribuição dos escores entre os grupos (tratamento ou controle). Valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5. RESULTADOS

Na análise microscópica das lâminas, obtidas por citologia uterina, 0h e aproximadamente 72h após a infusão, os animais avaliados não apresentaram endometrite subclínica ou citológica durante o experimento (Gráfico 1), não ocorrendo efeito de grupo ( $P=0,3$ ), hora ( $P=0,3$ ) ou interação (grupo x hora;  $P=0,07$ ). Foram observadas porcentagens médias de PMN no grupo controle ( $3,0\% \pm 1,7$ ;  $3,7\% \pm 2,3$ ) e grupo tratamento ( $0,3 \pm 0,1\%$ ;  $5,4 \pm 4,1\%$ ) em 0h e 72h, respectivamente.

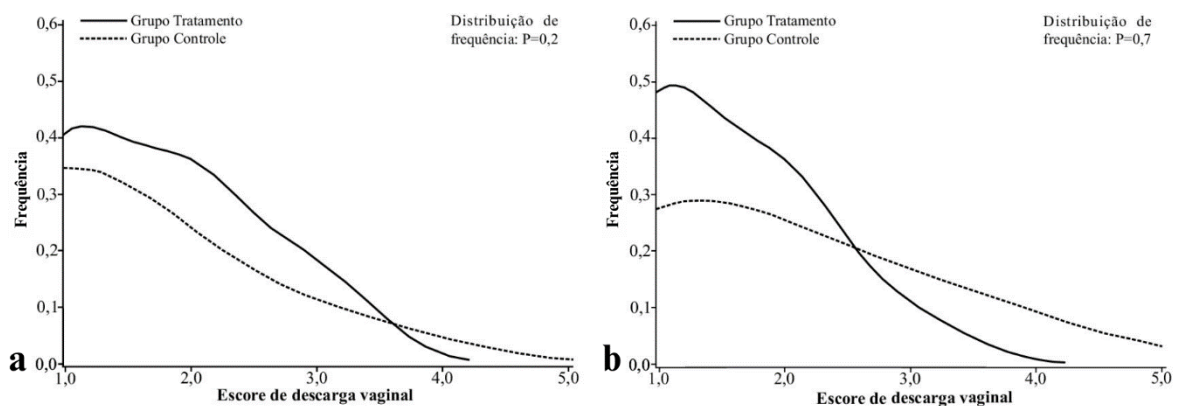
Gráfico 1 – Alteração quantitativa (%) de neutrófilos polimorfonucleares entre as citologias endometriais



Legenda: as citologias endometriais foram realizadas em todos os animais antes da infusão com soro ozonizado e aproximadamente após 72h. Não foram observados efeitos de grupo ( $P=0,3$ ), hora ( $P=0,3$ ) ou interação (grupo x hora;  $P=0,07$ ).

A avaliação de escore de descarga vaginal (EDV) utilizando *Metricheck*, também foi realizada nas mesmas ocasiões das citologias endometriais supracitadas. Nessa análise, foram demonstrados valores médios na categorização de escores para o grupo controle ( $1,36 \pm 0,81$ ;  $1,82 \pm 1,08$ ) e grupo tratamento ( $1,73 \pm 0,79$ ;  $1,55 \pm 0,69$ ) em 0h e 72h, respectivamente. Assim, a distribuição de frequência dos animais em cada escore não foi diferente entre os grupos (tratamento ou controle) em 0h ( $P=0,2$ ) e às 72h ( $P=0,7$ ), concentrando-se majoritariamente em escores de 1 a 3 (Gráfico 2).

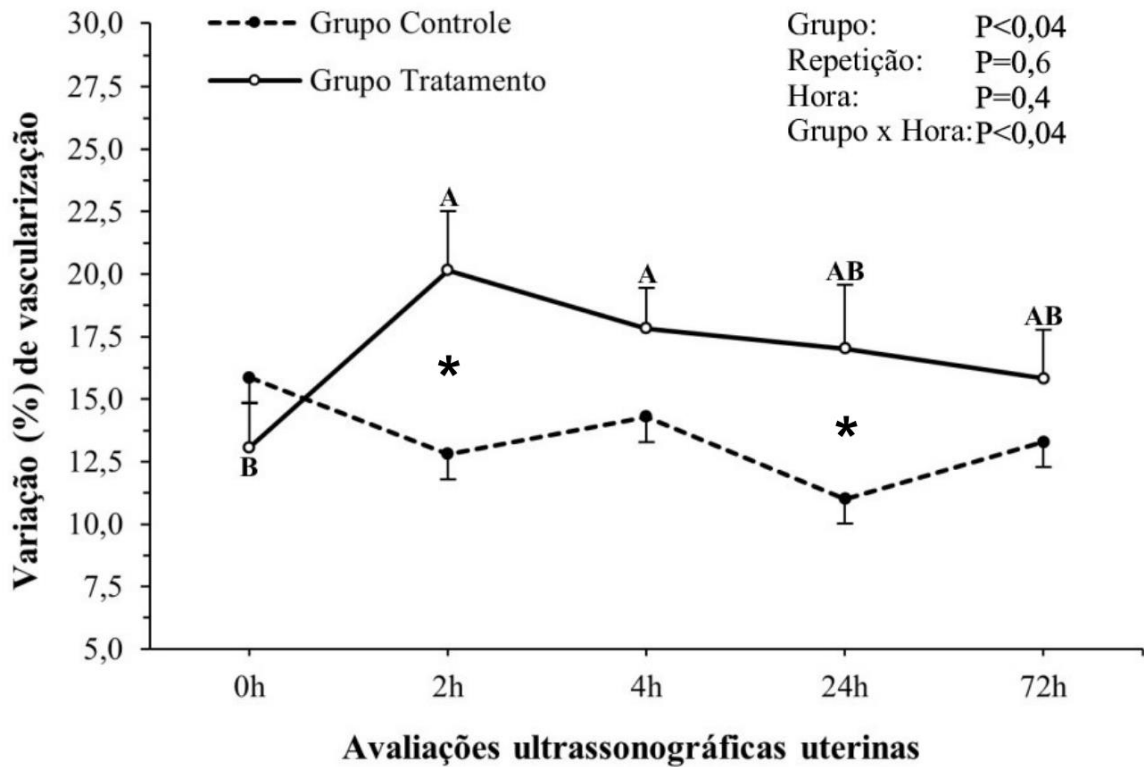
Gráfico 2 – Distribuição de frequência das caracterizações de escore de descarga vaginal



Legenda: as verificações de escore de descarga vaginal (EDV) foram realizadas em todos os animais antes da infusão com soro ozonizado e aproximadamente após 72h. A análise foi realizada pela distribuição de frequência dos animais em cada escore de EDV às 0h (a) e às 72h (b), comparando-se grupo tratamento e controle. A distribuição dos animais em cada escore não foi diferente entre os grupos em 0h ( $P=0,2$ ) e às 72h ( $P=0,7$ ).

As análises das variações no percentual de vascularização uterina nos exames ultrassonográficos estão apresentadas no Gráfico 3. O efeito da interação (grupo x hora), se deve ao efeito de hora significativo ( $p<0,05$ ) somente no grupo tratado com ozônio, demonstrado pelo aumento transitório na vascularização uterina entre as avaliações ultrassonográficas realizadas às 0h e 2h. A vascularização nesse grupo se manteve elevada até às 4h após o tratamento, retornando aos valores prévios ao tratamento às 24h e 72h ( $P<0,04$ ). Este aumento transitório somente no grupo tratado promoveu maiores vascularizações uterinas às 2h ( $20,15 \pm 2,37$  versus  $12,80 \pm 1,98$ ;  $p<0,02$ ) e às 24h ( $17,02 \pm 2,54$  versus  $11,00 \pm 1,33$ ;  $p<0,03$ ) após o tratamento, quando comparadas aos animais do grupo controle. Analisando todo o período experimental, houve efeito de grupo ( $p<0,04$ ), considerando que o grupo tratamento apresentou maior valor médio de vascularização uterina ao longo das horas após a infusão com soro ozonizado, em comparação ao grupo controle ( $16,78 \pm 2,04$  versus  $13,44 \pm 2,23$ ), respectivamente.

Gráfico 3 – Alteração relativa (%) da vascularização uterina referente às 0h e entre avaliações ultrassonográficas modo-Doppler



Legenda: as avaliações ultrassonográficas consistiram na análise do perfil de perfusão vascular previamente à infusão uterina com soro ozonizado (0h) e aproximadamente após 02h, 04h, 24h e 72h. Houve efeito de grupo ( $P < 0,04$ ), considerando que o grupo tratamento apresentou maior valor médio de vascularização uterina. Também foi observado efeito de interação grupo\*hora ( $P < 0,04$ ), e maior vascularização uterina dos animais do grupo tratamento às 2h ( $P < 0,02$ ) e às 24h ( $P < 0,03$ )\*. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, correspondem à diferença estatística. \* corresponde a diferença estatística considerando efeito grupo\*hora.

## 6. DISCUSSÃO

O presente modelo experimental foi desenvolvido em fêmeas bovinas saudáveis a fim de esclarecer efeitos da ozonioterapia intrauterina em animais hípidos. Este modelo é baseado na carência de estudos que tenham avaliado a perfusão sanguínea endometrial em vacas após administração de solução ozonizada. Além disso, o estudo com fêmeas que apresentam doença uterina clínica, detêm de algumas limitações relacionadas a padronização do grau de doença uterina, considerando sua variação de acordo com características individuais, como produção de leite, paridade, raça e mesmo a classe de microrganismos patogênicos presentes no útero.

Diante disso, a verificação da saúde uterina e ausência de endometrite citológica foi realizada por meio das citologias endometriais no início e final de cada período experimental. O diagnóstico de endometrite citológica em vacas normalmente é baseado na presença e proporções de células polimorfonucleares (PMN) em relação às células epiteliais endometriais presentes em esfregaço de citologia endometrial. A análise das lâminas coletadas no presente experimento seguiu a metodologia descrita previamente por Druker et al. (2022), que compararam diferentes limites máximos na contagem de PMN de citologias endometriais para diagnosticar endometrite citológica em primíparas e múltiparas. Para estabelecer esses valores de diagnóstico, os autores também consideraram o tempo pós-parto e desempenho reprodutivo das vacas.

Os resultados obtidos pela análise da concentração de neutrófilos polimorfonucleares acessados por meio da citologia endometrial demonstraram que não ocorreram alterações relacionadas ao ambiente uterino. Os valores obtidos na contagem de PMN foram próximos de 3,0% e 3,7% (grupo controle) e 0,3% e 5,4% (grupo tratamento) na primeira e segunda citologia endometrial, respectivamente. Segundo Madoz et al. (2013) o limite geralmente indicado é de 6% de células polimorfonucleares (PMN) por amostra, em que a contagem de células abaixo deste valor relaciona-se com a saúde uterina da fêmea. Todas as fêmeas se mantiveram saudáveis e sem a presença de endometrite subclínica durante o período experimental, indicando que não há efeitos colaterais na utilização da ozonioterapia intrauterina em bovinos, restringindo-se à endometrite citológica, dentro do prazo de 72h após infusão uterina.

Essa avaliação é relevante para auxiliar na segurança da implementação desta terapia, analisando os efeitos potenciais do ozônio em animais hípidos, que posteriormente poderiam ser analisados em animais com infecção uterina. Este método de citologia uterina é eficiente para detectar casos de endometrite subclínica, comumente presentes nos rebanhos bovinos (Barański et al., 2012), não demonstrando posteriores efeitos deletérios na fertilidade das fêmeas (Cardoso et al., 2017).

O aperfeiçoamento da ozonioterapia para uma futura inclusão no manejo reprodutivo dos rebanhos bovinos poderia ser uma alternativa viável para reduzir a ocorrência de endometrite subclínica e favorecer índices reprodutivos (Escandón et al., 2020). Estes fatores são justificados pelas pesquisas que demonstram que o ozônio detém de elevado potencial oxidante, devido à sua instabilidade e rápida transformação em oxigênio. Com isso, esses processos oxidativos na atividade da peroxidase podem destruir cápsulas bacterianas e membranas celulares, e conseqüentemente bloquear a replicação do DNA (Bocci et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com González-Aguado et al. (2021), que avaliaram o efeito da aplicação intrauterina de ozônio na migração de neutrófilos e endometrite subclínica em vacas pós-parto e nulíparas holandesas. Vacas com histórico de metrite pós-parto apresentaram maior contagem de PMN em relação às vacas saudáveis ( $13,9 \pm 6,2$  versus  $1,0 \pm 0,46$ ). Porém, quando os autores compararam somente vacas saudáveis, não houve diferença do grupo controle para o grupo que recebeu infusão uterina com o ozônio ( $0,1 \pm 0,1$  versus  $1,8 \pm 4,8$ ). Demonstrando que não houve aumento na contagem de PMN no endométrio após infusão intrauterina com ozônio em vacas saudáveis, como demonstrado na presente pesquisa.

Considerando as alterações na vascularização sanguínea causadas pelo ozônio no organismo, na presente pesquisa foi verificado aumento na perfusão vascular uterina. O modelo de avaliação proposto nesta pesquisa analisou as alterações na perfusão sanguínea uterina diretamente em cada corno uterino, a fim de indicar indiretamente o aporte sanguíneo endometrial após ozonioterapia. A análise da vascularização por meio da artéria uterina média pode se tornar de difícil adequação em modelos experimentais com fêmeas não gestantes, inviabilizando o procedimento de demais coletas nos horários pré-determinados.

Além da análise da perfusão vascular nos cornos uterinos proporcionar maior objetividade considerando a vascularização de um local anatômico padronizado. Diante dessas análises, as fêmeas que receberam infusão uterina com solução fisiológica ozonizada apresentaram aumento significativo na vascularização uterina às 2h e 24h após a infusão, em comparação aos animais do grupo controle. Além disso, analisando valores médios, os animais do grupo tratamento apresentaram maior vascularização uterina durante todo o período experimental, em comparação ao grupo controle.

Os trabalhos encontrados na literatura científica são escassos, considerando análises do efeito da ozonioterapia na vascularização uterina em bovinos. Porém, algumas pesquisas foram desenvolvidas na medicina humana. Calderon et al. (2016) analisaram o efeito da irrigação endometrial com solução salina ozonizada estéril sobre os parâmetros endometriais ultrassonográficos e histológicos em mulheres. A pesquisa foi feita durante três ciclos menstruais consecutivos, analisando três grupos: controle, sem intervenção e tratamento. Foi realizada irrigação endometrial com 10cc de solução estéril ozonizada em concentração de  $100 \mu\text{g O}_3/\text{ml}$ . Além da análise de demais parâmetros histológicos de tecido endometrial, foi feita avaliação do número de vasos sanguíneos, que foi maior para o grupo tratamento quando comparado ao grupo controle ( $30,48 \pm 11,38$  versus  $19,12 \pm 8,74$ ). Demonstrando o aumento na perfusão sanguínea causado pela ozonioterapia endometrial em mulheres.

Os resultados referentes a vascularização uterina, também corroboram com Camargo Ferreira et al. (2021), que descreveram melhorias na vascularização sanguínea do endométrio em éguas após insuflação uterina com ozônio. Foram empregadas as concentrações de 42, 21 e 0 (controle)  $\mu\text{g O}_3 \text{ ml}^{-1}$ . Na análise histológica das amostras de tecido endometrial, foram verificados efeitos positivos do tratamento com ozônio no número de vasos sanguíneos endometriais, grau de vascularização uterina e na taxa de aumento desses dois parâmetros avaliados.

Estes achados relacionados a vascularização uterina, podem ser explicados pelo maior aporte de oxigênio e consequente aumento na perfusão vascular causados pelo potencial de estressor terapêutico local, apresentado pelo ozônio quando empregado em doses reduzidas. Essa atuação como imunomodulador ocorre devido a ativação do sistema imune e estimulação da secreção de fatores de crescimento diversos, que induzem reações químicas que podem causar mudanças metabólicas no organismo. Esse efeito imunomodulador do  $\text{O}_3$  é relacionado a produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que tem capacidade de melhorar a atividade fagocítica de neutrófilos e favorecer a liberação de citocinas que auxiliam na resposta imunológica, como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-8, além de algumas proteínas de fase aguda (Bocci et al., 2011).

Souza et al. (2021) analisaram diversas pesquisas englobando características físico-químicas e aplicações do ozônio na medicina veterinária. Dentre estes fatores, os autores descreveram o potencial da ozonioterapia em aumentar a oxigenação e perfusão vascular do tecido. Essa relação pode ser explicada pela ativação de diversas reações bioquímicas, pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ocorre ativação da glicólise com aumento da produção de adenosina tri-fosfato (ATP) e 2,3-difosfoglicerato em glóbulos vermelhos, e alteração da curva de dissociação entre oxigênio e hemoglobina. Isso faz com que ocorra maior estímulo do fluxo transmembrana de  $\text{O}_2$ , melhorando a eficácia da cadeia respiratória mitocondrial. O efeito angiogênico do  $\text{O}_3$  pode ser relacionado ao aumento nos níveis da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Assim, elevando a síntese de óxido nítrico, substância que atua como vasodilatador e melhora a circulação sanguínea e a oxigenação dos tecidos isquêmicos.

Algumas pesquisas presentes na literatura científica demonstram efeitos favoráveis da ozonioterapia empregada no tratamento de desordens reprodutivas. Como Tekin et al. (2022), que analisaram os efeitos da ozonioterapia associada ao estradiol empregados no tratamento da síndrome de *Asherman* em modelos experimentais com ratos. Essa síndrome é caracterizada pela presença de adesões ou fibroses na cavidade uterina em decorrência de traumas ou processo de cicatrização. Os autores descreveram aumento no diâmetro e lúmen uterino e em glândulas

endometriais. Além do mais, o grupo tratado com estradiol e ozônio apresentou maior número e diâmetro de glândulas endometriais.

Neste raciocínio de desordens reprodutivas, Zobel e Tkalčić (2013) compararam diferentes abordagens terapêuticas para retenção de placenta em bovinos, incluindo aplicação parenteral de antibióticos e hormônios, além de lavagem uterina com ozônio. Os animais tratados com ozônio apresentaram menor número de serviços por concepção e consequente menor período de dias em aberto. E menor índice de descarte involuntário relacionado a problemas de fertilidade, demonstrando a eficácia da ozonioterapia na saúde uterina e fertilidades das vacas. Constantin e Bîrțoiu (2016) obtiveram resultados similares empregando a aplicação intrauterina de ozônio em forma de espuma no tratamento de endometrite em bovinos de leite. Descrevendo melhorias no desempenho reprodutivo relacionado a taxa de concepção ao primeiro serviço.

Diante disso, os resultados obtidos descrevem alterações na vascularização uterina promovidas pela ozonioterapia intrauterina em vacas de corte saudáveis. Pesquisas futuras podem explorar efeitos a longo prazo da infusão uterina com solução ozonizada no desempenho reprodutivo das fêmeas e analisar mecanismos relacionados ao efeito imunomodulador do ozônio no processo inflamatório uterino. Pode-se assim buscar o aperfeiçoamento de abordagens terapêuticas empregadas em desordens do trato reprodutivo, como metrite puerperal e endometrite que são comumente diagnosticadas em bovinos.

## 7. CONCLUSÃO

Portanto, o emprego da ozonioterapia intrauterina em bovinos hípidos promove melhorias na vascularização uterina analisada por meio de exame ultrassonográfico modo-Doppler. Esse efeito positivo na perfusão sanguínea uterina contribui na implementação desta terapia considerando quesitos de segurança e viabilidade da utilização desta alternativa terapêutica, auxiliando assim, no aperfeiçoamento da utilização da ozonioterapia na medicina veterinária.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2019.

- BARAŃSKI, W. et al. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 1939–1947, dez. 2012.
- BARLUND, C. S. et al. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 6, p. 714–723, 1 abr. 2008.
- BICALHO, M. L. S. et al. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 125–131, 25 maio 2012.
- BICALHO, R. C. et al. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5818–5830, dez. 2010.
- BOCCI, V. et al. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. **Medicinal Research Reviews**, jul. 2009.
- BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medical Gas Research**, BioMed Central Ltd., 2011.
- BOGADO PASCOTTINI, O. et al. Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical endometritis in dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 6, p. 1550–1556, 3 mar. 2016.
- BOLLWEIN, H.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2053–2061. 2002
- BORRELLI, E. A novel therapeutic option for chronic fatigue syndrome and fibromyalgia. **International Journal of Ozone Therapy**. v. 1, p. 149-153. 2002. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/267837113>>.
- CALDERON, I. et al. The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium – A preliminary study. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 36, n. 5, p. 635–640, 3 jul. 2016.
- CAMARGO FERREIRA, J. et al. Endometrial angiogenesis induced by uterine insufflation with an oxygen–ozone gas mixture in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 56, n. 9, p. 1176–1183, 1 set. 2021.
- CARDOSO, B. et al. Cytobrush: A tool for sequential evaluation of gene expression in bovine endometrium. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 6, p. 1153–1157, 1 dez. 2017.
- CHAPWANYA, A. et al. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1396–1407, jun. 2009.

- CONSTANTIN, T.; BÎRȚOIU, I. A. Preliminary Study on Ozone Therapy in Postpartum Endometritis of Dairy Cows. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 10, p. 384–389, 2016.
- DADARWAL, D. et al. Characterization of cytokine gene expression in uterine cytobrush samples of non-endometritic versus endometritic postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 126, p. 128–139, 1 mar. 2019.
- DE SOUZA, A. K. L.; COLARES, R. R.; DE SOUZA, A. C. L. The main uses of ozone therapy in diseases of large animals: A review. **Research in Veterinary Science**, Elsevier B.V., , 1 maio 2021.
- DEBERTOLIS, L. et al. Effects of induced endometritis on uterine blood flow in cows as evaluated by transrectal doppler sonography. **Journal of Veterinary Science**, v. 17, n. 2, p. 189–197, 2016.
- DJURICIC, D. et al. Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 3–4, p. 119–124, out. 2012.
- DRUKER, S. A. et al. Cytological endometritis diagnosis in primiparous versus multiparous dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 1, p. 665–683, 1 jan. 2022.
- DUBUC, J. et al. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5225–5233, nov. 2010.
- ĐURIČIĆ, D.; LIPAR, M.; SAMARDŽIJA, M. Ozone treatment of metritis and endometritis in Holstein cows. **VETERINARSKI ARHIV**, v. 84, n. 2, p. 103–110, 2014.
- DURIČIĆ, D.; VALPOTIĆ, H.; SAMARDŽIJA, M. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. **Animal Reproduction Science**, Elsevier B.V. 1 ago. 2015.
- DURRANI, A. Z. An Alternative Therapy with Ozone to Avoid Antimicrobial Resistance (AMR) in Uterine Infections in Dairy Cattle. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 1, n. 3, 28 ago. 2017.
- DZIĘCIOŁ, M. et al. Intravaginal administration of sildenafil citrate increases blood flow in the bovine uterus. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 59, n. 1, p. 91–97, 1 mar. 2015.
- ESCANDÓN, B. M. et al. Intrauterine therapy with ozone reduces subclinical endometritis and improves reproductive performance in postpartum dairy cows managed in pasture-based systems. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 5, p. 2523–2528, 1 set. 2020.
- FISCHER, C. et al. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 5, p. 818–829, 2010.

- FONTES, P. L. P.; OOSTHUIZEN, N. Applied Use of Doppler Ultrasonography in Bovine Reproduction. **Frontiers in Animal Science**, Frontiers Media S.A., , 2022.
- GABLER, C. et al. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 993–1004, 1 abr. 2009.
- GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, 1 jan. 2014.
- GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: Principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 12, p. 516–526, 2004.
- GIULIODORI, M. J. et al. Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3621–3631, jun. 2013.
- GONZÁLEZ-AGUADO, J. B. et al. Effect of intrauterine application of ozone on neutrophil migration and subclinical endometritis in dairy cattle. **Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**, v. 12, n. 4, p. 1264–1275, 1 out. 2021.
- GUIMARÃES, C. R. B. et al. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 237–241, 15 jul. 2015.
- HERATH, S. et al. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, 29 maio 2009.
- HONNENS, A. et al. Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, n. 7, p. 1048–1056, 15 out. 2008.
- JEON, S. J. et al. Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6324–6332, 2015.
- KASIMANICKAM, R. et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1–2, p. 9–23, jul. 2004.
- KASIMANICKAM, R. et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **Can Vet J**, v. 46, n. 3, p. 255-259. 2005.
- KAUFMANN, T. B. et al. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4 h after insemination and its effects on first service conception rate. **Theriogenology**, v. 71, n. 2, p. 385–391, 15 jan. 2009.
- KORZUN, W.; HALL, J.; SAUER, R. The Effect of Ozone on Common Environmental Fungi. **CLINICAL LABORATORY SCIENCE**, v. 21, n. 2, p. 107-111.

LEBLANC, S. J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, dez. 2011.

MACHADO, V. S. et al. The association of cow-related factors assessed at metritis diagnosis with metritis cure risk, reproductive performance, milk yield, and culling for untreated and ceftiofur-treated dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 10, p. 9261–9276, 1 out. 2020.

MADOZ, L. V. et al. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4333–4339, jul. 2013.

MELCHER, Y.; PRUNNER, I.; DRILLICH, M. Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 57–63, 1 jul. 2014.

OHTSUKA, H. et al. **Changes in leukocyte population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases**. p. 175–178, 2006.

PALHÃO, M. P. et al. Early resynchronization of non-pregnant beef cows based in corpus luteum blood flow evaluation 21 days after Timed-AI. **Theriogenology**, v. 146, p. 26–30, 1 abr. 2020.

PASCOTTINI, O. B.; LEBLANC, S. J. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. **Theriogenology**, v. 150, p. 193–200, 1 jul. 2020.

RIZZONI, L. B. et al. How early can nonpregnant ewes be detected based on the blood flow of the corpus luteum? **Small Ruminant Research**, v. 232, 1 mar. 2024.

SAMARDŽIJA, M. et al. Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: A review. **Veterinarski Arhiv**, v. 87, n. 3, p. 363–375, 2017.

SANTOS, N. R. et al. Postpartum endometrial cytology in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 739–745, 15 mar. 2009.

SCROLLAVEZZA, P. et al. **Ozone treatment in mastites, metrites and retention of fetal membranes in the cows**. Havana, Cuba: 1997.

SHARAWY, H. A. et al. The vaginal and uterine blood flow changes during the ovsynch program and its impact on the pregnancy rates in Holstein dairy cows. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, 1 dez. 2022.

SHARMA, A. et al. Mid-estrus uterine blood flow in endometritic and non-endometritic dairy cows using transrectal Doppler ultrasonography. **Biological Rhythm Research**, v. 52, n. 5, p. 803–808, 2021.

SHELDON, I. M. The postpartum uterus. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice** W.B. Saunders, 2004.

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–1530, maio 2006.

STANGAFERRO, M. L. et al. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part I. Metabolic and digestive disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7395–7410, 1 set. 2016.

TEIXEIRA, L. R. et al. Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 794–799, set. 2013.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; BOCCI, V. Topical Applications of Ozone and Ozonated Oils as Anti-Infective Agents: An Insight into the Patent Claims. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 130–142.

WAGENER, K.; GABLER, C.; DRILLICH, M. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. **Theriogenology**, Elsevier Inc., 1 maio 2017.

WITTROCK, J. M. et al. Short communication: Metritis affects milk production and cull rate of Holstein multiparous and primiparous dairy cows differently. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2408–2412, maio 2011.

ZAAYER, D.; VAN DER HORST, C. J. Non-fertility in cows: treatment with PGF and investigation of uterine biopsies. **Cytobios**, v. 45, n. 180, p. 55–70, 1986.

ZOBEL, R. et al. Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle Simmental cattle. **VETERINARSKI ARHIV**, v. 84, n. 1, p. 1–8, 2014.

ZOBEL, R.; TKALČIĆ, S. Efficacy of Ozone and Other Treatment Modalities for Retained Placenta in Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 1, p. 121–125, fev. 2013.