



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS**

**ANA CAROLINE ARAÚJO ÁVILA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**NOVEMBRO DE 2020**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS**

**ALUNA: ANA CAROLINE ARAÚJO ÁVILA**

**ORIENTADOR: RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 233/2020**

**BRASÍLIA/DF**  
**NOVEMBRO DE 2020**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS**

**ANA CAROLINE ARAÚJO ÁVILA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**Dr. RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA, FAV/UnB**  
**(ORIENTADOR)**

---

**DRA JULIANA TARGINO SILVA ALMEIDA E MACEDO, FAV/UnB**  
**(EXAMINADOR INTERNO)**

---

**DRA MARIA LÚCIA GAMABARINI MEIRINHOS, EVZ/UFG**  
**(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF, 17 de NOVEMBRO de 2020**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, obrigada pela oportunidade de participar em um programa de grande renome e por todo apoio recebido durante esse período.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xi
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO .....	02
2 REVISÃO LITERATURA .....	04
2.1. Endometrite .....	04
2.1.1 Etiologia da endometrite infecciosa .....	05
2.1.2 Diagnóstico .....	06
2.1.2.1 Cultura Microbiológica.....	06
2.1.2.2 Citologia uterina.....	06
2.1.3 Tratamento .....	07
2.1.3.1 Agentes ecbólicos .....	07
2.1.3.2 Antibióticos .....	08
2.1.3.3 Lavagem uterina e tratamento para biofilme .....	09
2.1.3.4 Agentes imunomoduladores .....	10
2.1.3.5 Plasma rico em plaquetas (PRP) .....	10

2.1.3.6 Células tronco .....	10
2.1.3.7 Vulvoplastia .....	10
2.2. Ozônioterapia .....	10
2.2.1 Principais vias de aplicação do ozônio .....	11
2.2.2 Doses de ozônio .....	11
2.2.3 Ações do ozônio sobre o sistema imune celular .....	12
2.2.4 Ação germicida do ozônio em processos sépticos .....	13
2.2.5 Ação do ozônio do trato reprodutivo de bovinos e equinos .....	14
2.2.6 Principais propriedades físico-químicas do óleo de girassol ozonizado (Olezon®) e seu vínculo com a atividade microbiana .....	15
3 REFERÊNCIAS .....	17

## CAPÍTULO 2

1 RESUMO .....	29
2 ABSTRACT .....	30
3 INTRODUÇÃO .....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1 Animais.....	33
4.2 Delineamento Experimental .....	33
4.3 Exames de cultura e citologia .....	35
4.4 Análise Estatística .....	35
5 RESULTADOS .....	36
6 DISCUSSÃO .....	39
7 CONCLUSÃO .....	43
8 REFÊRENCIAS .....	44

## RESUMO

### OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS

Ana Caroline Araújo Ávila<sup>1</sup>, Rodrigo Arruda de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia e Veterinária – UnB, DF

Objetivou-se com esse estudo avaliar se a ozonioterapia intrauterina em éguas pode ser usada como alternativa de tratamento para os casos de endometrite, pois este apresenta ação antimicrobiana, promove melhora sobre o sistema imunitário, é um tratamento de baixo custo e não acarreta resistência bacteriana. Vinte e cinco animais com histórico reprodutivo conhecido foram divididos em três grupos de forma balanceada, levando em consideração a idade e o histórico de infertilidade e inflamação uterina, previamente avaliada através de citologia para avaliação de polimorfonucleados e *swab* uterino para avaliação de cultura microbiológica de fungos e bactérias. O grupo controle G1 (n=7) recebeu o tratamento de lavagem uterina com soro ringer lactato sem a utilização do Ozônio; o grupo G2 (n=9) recebeu o tratamento de infusão direta de gás ozônio intrauterino, na concentração de 40mcg durante 10 minutos; e o grupo G3 (n=9) recebeu o tratamento com infusão intrauterina de óleo de girassol ozonizado. Os exames de citologia e *swab* uterino foram coletados antes e após os tratamentos para a avaliação dos resultados. Observou-se nos resultados obtidos no exame de cultura pós-tratamento que para o G1 57% (4/7) dos animais mantiveram a infecção uterina; enquanto 89% (8/9) e 78% (7/9) obtiveram resultado negativo para crescimento de microrganismos, em G2 e G3 respectivamente. Não houve diferença estatística para cultura uterina entre os grupos ( $P>0,05$ ). Na citologia uterina foi obtida uma média de neutrófilos/campo nos grupos G1, G2 e G3, respectivamente de:  $9,14 \pm 3,02$  para  $7,71 \pm 3,59$ ;  $10,67 \pm 3,84$  para  $2,89 \pm 3,59$ ;  $6,44 \pm 2,79$  para  $6,55 \pm 7,18$ . Não houve diferença estatística entre os grupos na citologia após tratamento ( $P>0,05$ ). Conclui-se que os tratamentos são eficazes contra a endometrite em éguas.

Palavras-chave: bactéria, equino, fungo, infecção uterina, ozônio, terapia.

## ABSTRACT

### OZONIOTHERAPY IN THE TREATMENT OF ENDOMETRITIS IN MARES

Ana Caroline Araújo Ávila<sup>1</sup>, Rodrigo Arruda de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Agronomy and Veterinary Medicine – UnB, DF

The objective of this study was to evaluate whether intrauterine ozone therapy in mares can be used as alternative treatment for cases of endometritis, as it has antimicrobial action, promotes improvement on the immune system, is a low-cost treatment and does not cause bacterial resistance. Twenty-five animals with a known reproductive history were divided into three groups in a balanced way, taking into account age and history of infertility and uterine inflammation, previously assessed through cytology and uterine swab. The G1 control group (n = 7) treatment of uterine lavage with ringer lactate serum without the use of Ozone; the G2 group (n = 9) treatment of direct intrauterine ozone gas infusion, at a concentration of 40mcg for 10 minutes; and group G3 (n = 9) treatment with intrauterine infusion of ozonated sunflower oil. The cytology and uterine swab exams were collected before and after treatments to evaluate the results. It was observed the results obtained in the post-treatment culture exam that for G1 57% (4/7) of the animals maintained the uterine infection; while 89% (8/9) and 78% (7/9) obtained negative results for the growth of microorganisms, in G2 and G3 respectively. There was no statistical difference for uterine culture between the groups ( $P > 0.05$ ). In uterine cytology, an average of neutrophils / fields was obtained in groups G1, G2 and G3, respectively:  $9.14 \pm 3.02$  to  $7.71 \pm 3.59$ ;  $10.67 \pm 3.84$  to  $2.89 \pm 3.59$ ;  $6.44 \pm 2.79$  to  $6.55 \pm 7.18$ . There was no statistical difference between groups in cytology after treatment ( $P > 0.05$ ). It is concluded that the treatments are effective against endometritis in mares.

Keywords: bacteria, equine, fungus, uterine infection, ozone, therapy.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem dos agentes etiológicos encontradas no exame de cultura microbiológica no pré-tratamento: 48% *Escherichia coli*, 24% *Aspergillus spp.*, 12% *Staphylococcus aureus*, 12% *Streptococcus sp.* e 4% *Cândida*. .....p.37

Figura 2: Porcentagem de eficácia no combate aos agentes etiológicos no exame de cultura microbiológica no pós-tratamento. Tratamento G1 57% manteve cultura positiva e 43% negativa, no tratamento G2 89% obteve cultura negativa e 11% se manteve positiva, no tratamento G3 78% obteve cultura negativa e 22% se manteve positiva. ....p.38

Figura 3: Média do número de neutrófilos/campo encontradas no exame de citologia pré e pós tratamento, respectivamente: G1 9.14 para 7.71, G2 10.67 para 2.89 e G3 6.44 para 6.55. .p.39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da utilização de concentrações e sua correspondência ao processo patológico. ....p. 11

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

µg: Micrograma

ARB: Bactérias resistentes a antibióticos

ARGs: Genes de resistência a antibióticos

CEUA: Comitê de uso e experimentação animal

COX2: Ciclo-oxigenase 2

DNA: Ácido desoxirribonucleico

H: Hora

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

IA: Inseminação artificial

Kg: Quilograma

L: Litro

LH: Hormônio luteinizante

Mcg: Micrograma

MHC II: Complexo de histocompatibilidade classe 2

Min: Minuto

mL: Mililitro

O<sub>3</sub>: Ozônio

PGF<sub>2</sub>α: Prostaglandina F<sub>2</sub>α

pH: Potencial hidrogeniônico

PRP: Plasma rico em plaquetas

UI: Unidade Internacional

## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

Das afecções que acometem o sistema reprodutivo, a endometrite é a maior causa de infertilidade nas éguas (Brinsko et al., 2011), sendo apontada como a terceira afecção clínica mais comum depois da cólica e das afecções do trato respiratório (Troedson, 1999). A infertilidade e o percentual alto de abortos acarretam grandes prejuízos para médicos veterinários e para criadores de equinos (LeBlanc & Causey, 2009). A endometrite é um processo inflamatório e/ou infeccioso, porém, quando tal inflamação persiste, torna o ambiente uterino inóspito ao conceito, podendo reduzir o potencial da fertilidade da égua (Pycock, 2009).

O útero da égua é exposto a uma grande variedade de microorganismos durante o processo de cobertura e pelo aumento das biotécnicas utilizadas na reprodução. Clinicamente, as éguas são divididas em resistentes ou em susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura (Troedsson, 1999); os animais que conseguem eliminar os patógenos dentro de 48H por meio de mecanismos de defesa uterina após a cobertura ou inseminação artificial, são resistentes e apresentam uma boa fertilidade; aquelas que possuem falha neste mecanismo de limpeza são consideradas susceptíveis, uma inflamação persistente promove altas concentrações de prostaglandina, resultando em luteólise precoce, diminuição de progesterona e consequente perda embrionária (Adans et al., 1987) e, pode desenvolver uma endometrite pós-cobertura ou uma endometrite aguda, e se esta não for tratada poderá se tornar crônica (LeBlanc, 2010).

Os mecanismos de defesa do útero equino contra microorganismos compreendem complexas interações de diferentes elementos, tais como componentes celulares, imunoglobulinas, sistema linfático funcional e fatores mecânicos (Melo et al., 2008). Watson (2000) verificou que tanto os agentes bacterianos como as leveduras geralmente são isoladas em éguas com histórico de infertilidade e em situações onde os mecanismos de defesa imunológicos estejam comprometidos.

Na medicina veterinária, há uma busca incessante de formas alternativas de tratamento economicamente viáveis e eficientes. A ozonioterapia é um exemplo, e já vem sendo amplamente utilizada na medicina humana na Europa, na Ásia e em Cuba (Scrollavezza et al., 1997). Além de ativar o metabolismo eritrocitário e das células imunes (Silva et al., 2009), o principal efeito fisiológico da ozonioterapia é sua ação antimicrobiana. O ozônio atua oxidando os microrganismos quer sejam fungos, vírus ou bactérias. Estes microrganismos são altamente susceptíveis à oxidação uma vez que não possuem um sistema protetor contra a oxidação como os mamíferos (Viglino, 2008). Além de possuir ação antimicrobiana, também possui um grande potencial para melhorar o sistema imune, não acarretar resistência bacteriana, além de ser um tratamento de baixo custo.

Objetivou-se com esse estudo avaliar se a ozonioterapia intrauterina em éguas pode ser usada como um possível tratamento para os casos de endometrite.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Endometrite

A endometrite se caracteriza pela infecção e/ou inflamação do endométrio (Troedsson, 1999), onde as infecções podem ser estabelecidas quando os mecanismos naturais (físicos e moleculares) de defesa estiverem comprometidos (Canisso et al., 2020). Clinicamente, as éguas são classificadas em suscetíveis ou resistentes à endometrite. As éguas suscetíveis possuem como fatores predisponentes a idade (Woodward et al., 2012), podem possuir alteração na conformação vulvar e útero penduloso (Scoggin, 2015), falha na contratilidade uterina, resposta imune uterina reduzida, e outros mecanismos de defesa prejudicados (Canisso et al., 2020).

Pode ser dividida de acordo com suas causas em infecciosa e não infecciosa, clinicamente ambas podem ocorrer juntas. Os sinais clínicos são indistinguíveis, porém na infecciosa ocorre a identificação de microrganismos (Canisso et al., 2020). LeBlanc (2010) divide a endometrite em infecção aguda, infecção crônica e em endometrite persistente pós cobertura. Nas fases aguda e subaguda, ocorre a produção de muco pelas células epiteliais do endométrio (LeBlanc et al., 2007); na endometrite crônica ocorre a perda do epitélio, maiores oportunidades para adesão bacteriana e diferentes graus de fibrose (Causey et al., 2018).

Um desequilíbrio dos mecanismos pró e anti-inflamatórios desempenham um papel fundamental na imunopatogênese da endometrite (Canisso et al., 2020). A neutrofilia persistente, o acúmulo de fluido intrauterino e a prolongada produção de citocinas pró-inflamatórias são embriotóxicas e acarretam a queda do potencial de fertilidade das éguas tanto na monta natural como na inseminação artificial (Robertson et al., 2018). Tradicionalmente a endometrite é tratada com lavagem uterina, agentes ecbólicos, anti-inflamatórios e antibióticos

(Canisso et al., 2016). Porém, a queda da eficácia do tratamento convencional e a maior incidência de microrganismos resistentes aos antibióticos, levou ao desenvolvimento de terapias alternativas (Scoggin, 2016).

### **2.1.1 Etiologia da endometrite infecciosa**

A endometrite infecciosa pode ocorrer na presença de bactérias e/ou fungos. As bactérias mais comumente isoladas são *Streptococcus* sp, Coliformes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Canisso et al., 2016). Entre todos, *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* e *Escherichia coli* predominam como causa de endometrite aguda e crônica, respectivamente (Frontoso et al., 2008). A endometrite pode ser influenciada pela patogenicidade da bactéria e pela resposta imune pra tal; o que pode resultar em diferentes sinais clínicos pela ultrassonografia e achados laboratoriais (Otto, 2006). A *Escherichia coli* adere às superfícies epiteliais, dificultando sua remoção física; os *Streptococcus* sp estimulam a produção de um exsudato inflamatório, interferindo na fagocitose dos neutrófilos (LeBlanc, 2010). Estudos mostram que animais com infecção de *E. coli* não mostram alteração no resultado de citologia uterina, diferentemente do que ocorre com infecção de *Streptococcus* sp (Rua et al., 2018).

Já os fungos mais usualmente isolados são *Aspergillus* sp e *Candida albicans*, mas outras espécies menos comuns podem ser encontradas como o *Mucor* sp (Beltaire et al., 2012). A endometrite fúngica é menos comum (1-5%) e pode ocorrer em associação com a bactéria. Deve ser notado que a endometrite fúngica ocorre como uma infecção oportunista e tem sido identificada após repetidos tratamentos com antibioticoterapia (Stout, 2008).

O útero das éguas suporta uma diversidade moderada de microrganismos e, sua composição, está amplamente relacionada com a microbiota encontrada no orifício cervical externo (Heil et al., 2018). Essa comunicação da população microbiana entre a vagina e o útero pode ser explicada pela abertura da cérvix durante o estro e a proximidade do lúmen uterino com a vagina (Heil et al., 2019). As éguas suscetíveis são propensas a desenvolver infecção crônica e, algumas dessas infecções, são devido a capacidade de bactérias e fungos produzirem biofilme (Ferris, 2017).



## 2.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico de endometrite envolve uma abordagem multimodal incluindo a avaliação clínica, o histórico reprodutivo (útero penduloso, alteração conformacional da vulva, idade, histórico de infertilidade ou subfertilidade), palpação transretal com auxílio da ultrassonografia para exame do trato reprodutivo (presença de líquido uterino), utilização do espéculo para examinar vagina e cérvix (secreção vaginal, pneumovagina, cérvix tortuosa) e os exames de cultura, citologia e biópsia uterinas (Amorim et al., 2016). Essas três últimas são os exames mais utilizados para diagnosticar endometrite em éguas (Nielsen, 2005).

### 2.1.2.1 Cultura microbiológica

A cultura uterina deve ser realizada antes de qualquer outro procedimento uterino ou vaginal para evitar a contaminação, com o intuito de examinar o crescimento microbiológico de fungos e bactérias. Pode ser feita com o *swab*, pelo lavado uterino de baixo volume ou pela biópsia (Nielsen et al., 2012).

### 2.1.2.2 Citologia uterina

A citologia uterina pode ser utilizada para avaliar a proporção entre as células inflamatórias e as células endometriais. Ocasionalmente também pode detectar a presença de colônias de bactérias, hifas e cristais de urina. A citologia pode ser obtida através do *swab* com simples ou dupla proteção, com a escova citológica ou com o lavado uterino de baixo volume (Ferris et al., 2015). Os esfregaços obtidos com a escova citológica acarretam uma maior quantidade celular (polimorfonucleados e endometriais) quando comparados com o *swab* (Walter et al., 2012). A utilização da escova para coleta do material obtém um bom resultado em relação ao número de células polimorfonucleadas e número de colônias de *Streptococcus β-hemolíticos*, o que não é observado quando o isolamento bacteriano primário foi de

*Escherichia coli* (Christoffersen et al., 2015). A endometrite não infecciosa também leva a quimiotaxia de neutrófilos para o lúmen uterino, assim sendo, amostras de cultura uterina sempre devem ser colhidas e avaliadas juntamente com a citologia (Canisso et al., 2020).

### **2.1.3 Tratamento**

A patobiologia dos microrganismos associados a endometrite em éguas tem sido mal compreendida em relação a microbiota uterina residente na prevenção de infecções e como o tratamento altera a composição dessa população microbiana (Canisso et al., 2020). Terapias tradicionais e não tradicionais para a endometrite são baseadas no reestabelecimento dos mecanismos de defesas naturais. A tendência atual de prevenir o uso indiscriminado de antibióticos em animais e humanos se beneficiará a partir dessas contínuas tentativas de se desenvolver terapias alternativas para tratar a endometrite (Canisso et al., 2020).

#### **2.1.3.1 Agentes ecbólicos**

Os agentes ecbólicos são utilizados com intuito de estimular as contrações uterinas para eliminar o acúmulo de líquido intrauterino pela cérvix e pela drenagem linfática (Cadario et al., 1995). A ocitocina é a mais utilizada, tipicamente administrada uma hora antes da cobertura, quatro horas após a cobertura e 72 horas após ovulação (Brinsko et al., 1991). Baixas doses de ocitocina (10-20 unidades) induzem rápidas contrações uterinas de curta duração, enquanto altas doses (40 unidades) resulta em contrações menos efetivas (Campbell & England, 2002). A carbetocina, um análogo da ocitocina, é outra droga ecbólica utilizada para promover contrações uterinas de médio a longo prazo quando comparado com a ocitocina (Steckler et al., 2012).

Outro agente ecbólico utilizado é o cloprostenol ou dinoprost trometamina, um análogo sintético da prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>). Este induz uma ação miometrial mais longa (5 horas) (LeBlanc, 2003). Portanto, pode acarretar sinais de cólica, sudorese, contrações abdominais e taquipneia (Irvine et al., 2002). A administração da PGF<sub>2α</sub> 18-24 horas pós

ovulação pode comprometer a formação e a função do corpo lúteo, resultando em uma alteração da concentração sistêmica da progesterona e diminuindo as taxas de prenhes (Nie et al., 2002).

### 2.1.3.2 Antibióticos

Os antibióticos mais utilizados para tratar endometrite equina incluem os betalactâmicos (ceftiofur, ampicilina, penicilina) e os aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) (Dascanio, 2011). Os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistente aos antibióticos incluem a modificação do sítio de ligação celular impedindo a ligação do antibiótico através da síntese de enzimas que digerem o agente antimicrobiano; ativação de vias alternativas que contornam o mecanismos de ação do antibiótico; envio de sinal negativo (*down regulation*) ou eliminação das purinas nas transmembranas, local por onde os princípios ativos das drogas adentram a célula; e eliminação das drogas por bombas de efluxo (Giguère, 2013).

Os antibióticos utilizados no tratamento da endometrite podem ser utilizados por infusão intrauterina ou de forma sistêmica. Deve ser ressaltado que nem todos os antibióticos utilizados por via sistêmica podem ser administrados no útero sem alguns ajustes. Como a enrofloxacina que pode levar a necrose uterina (Rodriguez et al., 2012), porém quando administrada com outra suspensão (infusão intrauterina de 50mL com uma suspensão a base de água com 2,5% de enrofloxacina), pode levar a uma inflamação transitória, mas pode ser útil para o tratamento de endometrite de bactérias sensíveis a esse princípio ativo sem os efeitos deletérios gerados no útero (Schnobrich et al., 2015).

As evidências sobre a via mais adequada para a administração dos antibióticos são conflitantes. A administração intrauterina leva a uma menor alteração microbiana de outros sistemas do corpo, atinge uma maior concentração local e se tem uma menor quantidade do medicamento administrada (LeBlanc, 2009). Já a administração pela via sistêmica por períodos prolongados pode resultar em complicações indesejáveis como a diarreia, colite e reações anafiláticas sistêmicas (Dascanio, 2011). Em contrapartida, a administração intrauterina pode acarretar irritação do endométrio resultando na endometrite não infecciosa. Além disso, presume-se que a penetração do antibiótico no tecido uterino é inconsistente o que favorece o desenvolvimento da resistência aos antibióticos principalmente naqueles casos de infecção latente pelo *Streptococcus* sp. (Canisso et al., 2020).

Os tratamentos para a endometrite fúngica não estão bem elucidados, pois há um déficit de estudos controlados na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos antifúngicos (Canisso et al., 2020). O tratamento inicial deve abordar os fatores predisponentes como má conformação perineal, uso inadequado de antibióticos e imunossupressão e deve ser utilizada lavagens uterinas associadas a fármacos ecbólicos. A eliminação dos fatores predisponentes à endometrite pode levar a restauração da fertilidade (Dascanio et al., 2001). No entanto, três medicamentos antifúngicos podem ser utilizados para tratar a endometrite. Os polienos são considerados drogas fungicidas e, os azóis, são fungistáticos (imidazóis e triazóis) (Guiguère et al., 2013). Os resultados *in vitro* indicam que os polienos (anfotericina B, natamicina, nistatina) são mais eficazes no tratamento do que os azóis (cetoconazol, fluconazol e miconazol) (Beltaire et al., 2012).

### **2.1.3.3 Lavagem uterina e tratamento para biofilme**

A lavagem uterina é recomendada para éguas com excessivo acúmulo de fluido uterino (Brinsko et al., 2003). As soluções cristaloides mais utilizadas para a lavagem uterina são o ringer com lactato e a solução salina 0,9% (Vanderwall & Woods, 2003). Todavia, estudos demonstraram que a *Escherichia coli* pode utilizar o lactato presente no soro como substrato para crescimento (Eisenberg & Dobrogosz, 1967). Portanto, essas soluções podem ser conjugadas com antissépticos e aditivos para quebrar biofilme como os mucolíticos (N-acetilcisteína, dimetilsulfóxido) (Canisso et al., 2020).

A lavagem uterina ajuda a remover microrganismos, detritos, células inflamatórias e espermatozoides mortos do lúmen, pois estes podem ser prejudiciais para o embrião após cobertura e para os espermatozoides antes da cobertura (Knutti et al., 2000). Pode ser realizado a qualquer momento antes da cobertura e após quatro horas da cobertura, pois este é reconhecido como tempo mínimo necessário para o esperma atingir as tubas uterinas (Fiala et al., 2007). Além disso, a lavagem uterina pode estimular a migração de neutrófilos viáveis para restabelecer a degradação dos microrganismos, nos casos onde haja uma estagnação do estado inflamatório (Canisso et al., 2020).

#### **2.1.3.4 Agentes imunomoduladores**

Um estudo demonstrou que o uso dos anti-inflamatórios não esteroidais junto com a ocitocina pôde afetar positivamente a fertilidade em éguas com histórico de endometrite persistente pós cobertura (Rojer, H. & Aurich, C., 2010). Uma alternativa são os anti-inflamatórios não esteroidais COX-2 seletivos. Foi demonstrado que o Firocoxib foi capaz de mitigar a resposta inflamatória após a cobertura sem afetar as taxas de ovulação (Friso et al., 2019).

Os glicocorticoides também podem ser utilizados. A administração da dexametasona antes da cobrição reduz a inflamação endometrial e melhora as taxas de prenhez em éguas estéreis ou com histórico de endometrite persistente pós cobertura (Bucca et al., 2008). Já a administração repetida de dexametasona e prednisolona, pode suprimir o aumento do hormônio luteinizante (LH) e aumentar a taxa da falha na ovulação (Ferris & Mccue, 2010). Sendo assim, é recomendado a aplicação de dose única para o tratamento da endometrite persistente pós cobertura.

#### **2.1.3.5 Plasma rico em plaquetas**

Plasma rico em plaquetas (PRP) é o plasma do sangue total com plaquetas concentradas que tem sido muito utilizado na clínica equina (Pereira et al., 2019). A partir da aplicação intrauterina de 20mL de PRP 24 horas antes e 4 horas após a inseminação notou-se uma diminuição dos polimorfonucleados na citologia, um aumento a taxa de concepção e uma diminuição da COX-2 (Segabinazzi et al., 2017).

#### **2.1.3.6 Células tronco**

O uso de células tronco mesenquimais adquiriu grande importância na medicina humana e veterinária principalmente como modulador de processos inflamatórios (Barrachina et al., 2016). Essas células podem se diferenciar em células esqueléticas, mioblastos,

parênquima renal, epitélio hepático, epitélio cutâneo e intestinal, células neuroectodérmicas (Grove et al., 2004) e em células endometriais (Du & Taylor, 2007). Devido a sua diferenciação distinta e a capacidade imunomoduladora e de migração, as células estromais do mesênquima endometrial podem fornecer uma elevada fonte de células terapêuticas para a regeneração tecidual (Rink et al., 2018).

Foi demonstrado que a infusão intrauterina de células tronco autólogas da medula óssea em éguas é um procedimento seguro resultando em uma resposta inflamatória de curto prazo (Rink et al., 2018). A infusão intrauterina de células troncos autólogas, obtidas através de biopsias uterina, podem ser realizados com segurança durante o diestro inicial. As células tronco mesenquimais foram detectadas no útero em até 24 horas após infusão, contudo essas células não enxertam no endométrio saudável. Esses resultados destacam o potencial do endométrio como uma nova fonte de células terapêuticas para condições inflamatórias e degenerativas do útero (Alvarenga et al., 2016).

### **2.1.3.7 Vulvoplastia**

A cirurgia de vulvoplastia é um procedimento que promove uma proteção do trato reprodutivo, evitando pneumovagina e contaminação fecal. Sendo assim, em éguas com problemas de conformação perineal, recomenda-se a realização do procedimento para prevenir infecções bacterianas e consequentemente aumentar a fertilidade de éguas (Seabaugh & Schumacher, 2014).

## **2.2 Ozônioterapia**

O Ozônio ( $O_3$ ) é uma variedade alotrópica do elemento de oxigênio que contém um átomo a mais do que o oxigênio atmosférico. Essa substância se apresenta instável e se decompõe espontaneamente em oxigênio diatômico. Essas características dificultam o transporte e armazenamento do ozônio sendo necessário a produção no momento da utilização (Rodríguez et al., 2018).

A reatividade química do O<sub>3</sub> e do oxigênio diferem acentuadamente, embora o segundo se combine com quase todos os elementos. O oxigênio apresenta reatividade com temperaturas elevadas, enquanto o O<sub>3</sub> apresenta com temperatura ambiente e pressão atmosférica. O O<sub>3</sub> possui capacidade de reagir com uma grande quantidade de compostos, como os fosfolipídios, lipoproteínas, envelopes celulares de bactérias e capsídeos virais (Smith et al., 2017).

Os efeitos benéficos da ozônioterapia são alcançados através de uma reação química inicial, que se origina a partir do contato de cada molécula de ozônio com as ligações duplas de cadeias de lipídios que constituem as paredes de membranas celulares. Com isso geram uma série 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).

### **2.2.1 Principais vias de aplicação do ozônio**

Segundo Viglino (2008), em equinos pode ser utilizado por via sistêmica, via retal, venosa, muscular e auto hemoterapia, ou através da aplicação local pelas vias subcutânea, intrasinovial, intrarticular, subfacial, peritendinosa, epidural e intramuscular.

Pesquisadores acreditam que a ozônioterapia possa auxiliar no tratamento das endometrites degenerativas através da melhora da circulação sanguínea do endométrio obtendo um aumento nos índices de fertilidade através da redução nas reações inflamatórias pós IA. Igualmente, ser útil no tratamento da subfertilidade de garanhões que tenham comprometimento na oxigenação das células envolvidas na espermatogênese (Leal Junior, 2012). A terapia intrauterina com ozônio demonstrou ter propriedades como imuno estimulador, imuno modulador e antiinflamatório (Ganaie et al. 2018).

### **2.2.2 Doses do ozônio**

Se considerarmos que partimos da indução de um pequeno estresse oxidativo capaz de despertar o sistema antioxidante endógeno, então devemos considerar que este deve

ser bem controlado, levando em consideração o processo patológico e a gravidade da doença. Portanto, é essencial que a dosagem a ser empregada seja calculada de forma a evitar o stress oxidativo grave e irreversível saturando o sistema antioxidante com conseqüente dano para as membranas celulares. As concentrações utilizadas são selecionadas dependendo do quadro clínico do paciente e da via de aplicação selecionada (Tabela 1) (Rodríguez et al., 2018).

Tabela 1: Tabela de referência na utilização de concentrações e sua correspondência à via de aplicação e ao processo patológico.

<b>Concentração de ozônio</b>	<b>Via de aplicação</b>	<b>Processo patológico</b>
70 e 100 µg/kg	Local	Feridas com infecção grave
40 e 70 µg/kg	Local	Escaras, úlcera não severamente sépticas
10 e 40 µg/kg	Sistêmico, auto hemo maior, retal e intramuscular	Acompanhando o tratamento local dos processos anteriores

### 2.2.3 Ações do ozônio sobre o sistema imune celular

Muitos estudos têm revelado que o O<sub>3</sub> estimula um número de células do sistema imune (Sháñez et al., 2012). Esse efeito é devido a reação do O<sub>3</sub> com os ácidos graxos poli-insaturados e outros antioxidantes. Quando os compostos da peroxidação são formados, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se difunde dentro das células do sistema imune regulando a sinalização o que facilita a resposta imune (Caliskan et al., 2011).

Os primeiros estudos realizados *in vitro* demonstraram os efeitos do ozônio sobre o sistema imunológico datam da década denoventa. Dentro destes, se avaliou a ação de diferentes concentrações de ozônio (10-90 µg/mL) sobre o sangue periférico durante alguns minutos e após as setenta e duas horas posteriores. Foi observada a liberação de forma progressiva de pequenas quantidades de citocinas, como: interferon-β, fator de necrose tumoral alfa, diversas interleucinas, o fator estimulador de colônias de macrófagos e o fator



transformador do crescimento  $\beta 1$ . Esses resultados formaram a primeira hipótese sobre a ação do ozônio com o sangue periférico *in vitro* (Bocci, 1994 e Bocci et al., 1994).

Outros estudos demonstraram que essa ação varia de acordo com a concentração utilizada, com o estado inicial da célula e do animal tratado. Como mostrado no estudo de Janic et al. (2003), as células expostas ao ozônio e posteriormente estimuladas com lipossacarídeos mostraram uma redução significativa de liberação do fator de necrose tumoral alfa quando comparada às células controle. Ohtsuka et al. (2006), utilizou o tratamento de ozônio em vacas saudáveis e em vacas com processos inflamatórios (mastite, artrite e queimaduras solares) na concentração de 10 $\mu$ g/ml para uma dose de 20  $\mu$ g/kg, pela via de auto-hemoterapia maior. Os resultados demonstraram que nos animais com processos inflamatórios obtiveram uma redução significativa dos linfócitos com receptores CD-14, aumento da relação CD4/CD8 e do teor de células B-MHC II, em comparação com os animais considerados saudáveis.

Com base nesses estudos, podemos sugerir que o ozônio aplicado em animais com processos inflamatórios, foi capaz de modular a resposta inflamatória mediante a redução da expressão de receptores CD-14, receptor envolvido diretamente na resposta inflamatória sistêmica em modelos experimentais de sepsia (Thorgerson et al., 2009).

#### **2.2.4 Ação germicida do ozônio em processos sépticos**

A ação oxidante do O<sub>3</sub> leva a destruição das paredes bacterianas e das membranas citoplasmáticas de fungos, além de agir contra os protozoários e vírus (Rodríguez et al., 2018).

Thanomsub et al. (2002), demonstrou as mudanças estruturais causadas em bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), por exposição do ozônio a 0,167 mg/min/L. O resultado foi a deformação da membrana celular, a ruptura desta com perda de conteúdos intracelulares e a destruição da bactéria, mediante um escaneamento de microscopia eletrônica.

Foi demonstrado também a eficácia do tratamento com ozônio (70  $\mu$ g/ml) a uma dose de 1 mg/kg/dia durante dez dias por via intraperitoneal, num modelo experimental de mediastinite em ratos, induzido por inoculação de 0,5mL de uma suspensão contendo 10<sup>8</sup> UFC/mL de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. A quantidade de bactérias diminuiu significativamente nos animais tratados com ozônio, mesmo atingindo resultados superiores

quando aplicado em combinação com a vancomicina (40 mg/kg) (Gulmen et al., 2013). O potencial antimicrobiano do O<sub>3</sub> é útil para reduzir a carga bacteriana em feridas e acelerar a cicatrização. Quando combinado com clorexidina, observa-se a potencialização da ação do O<sub>3</sub> na atividade antibacteriana e antifúngica (Borges et al., 2017).

Jiang et al. (2019) relatou que a inativação do Poliovírus 1 pelo O<sub>3</sub> está associada a danos ao genoma viral. O O<sub>3</sub> atua nos fungos por meio do mesmo mecanismo oxidativo usado nas membranas celulares. A formulação gasosa e oleosa tem sido usado em três gêneros comuns de dermatófitos (Epidermophyton, Microsporum e Trichophyton), revelando seus efeitos fungicidas e inibitórios na esporulação. O O<sub>3</sub> também atua reduzindo a produção das enzimas necessárias para interações fungo-hospedeiro e fungo-fungo, que normalmente são produzidas para facilitar sua multiplicação dentro do hospedeiro (Ouf et al., 2016).

Em relação às leveduras, um estudo realizado por Zargarán et al. (2017) avaliaram os efeitos fungicidas do O<sub>3</sub> em diferentes formas de *Candida albicans*; concluíram que o ozônio foi altamente eficaz contra a forma de levedura, pode inibir a formação de tubos germinativos, não faz remoção completa dos biofilmes mesmo após 60 min de exposição, e também se concluiu que a terapia com ozônio induz resistência à anfotericina B.

Além disso, em um estudo sobre candidíase vulvovaginal recorrente, 85% dos pacientes humanos se recuperaram com água ozonizada, 10% permaneceram assintomáticos e apenas 5% não responderam à terapia com O<sub>3</sub> (Schwartz, 2015). A ação do O<sub>3</sub> contra protozoários foi demonstrada in vitro com diferentes parasitas, como Leishmania Giardia, Cryptosporidia e Microsporidia usando óleo ozonizado e água ozonizada (Rajabi et al., 2015).

### **2.2.5 Ação do ozônio do trato reprodutivo de bovinos e equinos**

A ozonioterapia tem sido frequentemente utilizada na medicina veterinária no tratamento de doenças uterinas como metrite, endometrite, retenção de placenta, vaginite, urovagina e mastites (Samardžija et al. 2017).

Foi demonstrado que 20mL de ozônio insuflado via intrauterina em vacas entre 06 a 24 horas pós parto reduziu significativamente o intervalo de partos e o número de inseminações para gestação. Concluindo que o tratamento preventivo com o gás de ozônio intrauterino representa uma opção terapêutica eficaz para melhorar a fertilidade das vacas Simental (Zobel et al., 2014).

Scrollavezza et al., 1997, demonstrou utilizando o ozônio em forma de spray em casos de metrite em vacas, de oito a dez segundos, através de um cateter. O mesmo procedimento foi utilizado para o tratamento de endometrite em animais que se encontravam na fase folicular. Após a primeira e segunda aplicação, mais de 80% dos animais se curaram de endometrites causada por *Arcanobacterium pyogenes*.

Um estudo recente com vacas leiteiras teve o objetivo de avaliar o efeito da terapia intrauterina com ozônio no pós-parto precoce em animais com endometrite subclínica. O exame de citologia uterina foi realizado 35 dias pós parto e 72 h após o tratamento com ozônio. Foi observada uma redução dos leucócitos, da porcentagem de endometrite, do número de serviços por concepção e no intervalo de parto do grupo tratado em comparação com o grupo controle. E um aumento na taxa de concepção no primeiro serviço do grupo tratado em comparação com o grupo controle. Concluindo que a ozonioterapia intrauterina 35 dias após o parto reduziu a prevalência de endometrite subclínica e melhorou o desempenho reprodutivo em vacas leiteiras pós-parto (Escandón et al., 2020).

A ozonioterapia mostrou resultados muito promissores no tratamento de distúrbios puerperais em vacas, cabras e ovelhas como alternativa no uso de antibióticos. Na verdade, a ozonioterapia provou ser mais eficaz do que a terapia alopática, melhorando o aspecto fisiológico da regressão uterina (Đuričić et al. 2016).

## **2.2.6 Principais propriedades físico-químicas do óleo de girassol ozonizado (Olezon®) e seu vínculo com a atividade microbiana**

O Olezon® tópico é um medicamento cubano, obtido a partir da reação de O<sub>3</sub> com óleo de girassol, de acordo com um procedimento desenvolvido por cientistas no Centro Nacional de Pesquisa Científica (NECIC) (Molerio et al., 2009). Devido sua natureza e origem, a caracterização físico-químicas de Olezon® tópico requer a combinação de um conjunto de técnicas analíticas que caracterizem os compostos ativos no medicamento, responsáveis pela ação germicida do produto e a suas propriedades reológicas e organolépticas ).

Quando o O<sub>3</sub> reage com as triglicérides insaturadas presentes em óleos vegetais podem formar uma série de espécies de peróxidos, que são responsáveis pela ampla atividade biológica dos óleos vegetais ozonizados (Rodríguez et al., 2018).

O peróxido deve ser o mais baixo possível, para manter o seu valor nutritivo e não incorporar ao organismo os produtos de oxidação de seus componentes insaturados. Pois, o processo de oxidação transite por uma via de formação de radicais livres, aspecto que não ocorre durante a ozonização de óleos vegetais. Durante a ozonização de óleos se formam espécies peroxídicas, mas de uma natureza diferente das que são formados durante a oxidação. Esses compostos peroxídicos são os responsáveis pela ação fungicida do Olezon<sup>®</sup> tópico. Resultado este obtido por um método simples, rápido, de baixo custo e muito valioso para o estudo da qualidade de óleos vegetais ozonizados (USP, 2012).

O índice de acidez, por sua vez, normalmente aumenta durante a ozonização de óleo de girassol, devido a formação de ácidos carboxílicos pela decomposição de hidroxidoperóxidos formados durante a ozonização. Estes ácidos se encontram em equilíbrio com compostos peroxídicos, fundamentalmente responsáveis pela ação germicida do medicamento. Esses ácidos carboxílicos contribuem para a ação biológica do medicamento ao modificar o pH intra e extracelular e com ele se transformam os processos de troca em membranas dos microrganismos (Rodríguez et al., 2018).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANS, G. P., KASTELIC, J. P., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. The Effect of uterine inflammation and ultrasonically detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 445-454, 1987.

ALVARENGA, M. A., DO CARMO, M. T., SEGABINAZZI, L. G. GUASTALI, M. D., MAIA, L., LANDIM-ALVARENGA, F. C. Feasibility and safety of endometrial injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 42, p. 12-18, 2016.

AMORIM M. D., GARTLEY, C. J., FOSTER, R. A., HILL, A., SCHOLTZ, E. L., HAYES, A., CHENIER, T. S. Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of Equine Endometritis. **J. Equine Vet. Sci.**, v.44, p. 54-61, 2016.

BARRACHINA, L., REMACHA, A. R., ROMERO, A., VÁZQUEZ, F. J., ALBAREDA, J., PRADES, M., RANERA, B., ZARAGOZA, P., MARTÍN-BURRIEL, I., RODELLAR, C. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 171, p. 57-65, 2016.

BELTAIRE, Katherine A.; CHEONG, Soon Hon; COUTINHO DA SILVA, M. A. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999–2011). **Equine veterinary journal**, v. 44, p. 84-87, 2012.

BOCCI V., LUZZI L., CORRADESCI F., SILVESTRI S. Studies on the biological effects of ozone: 6. Production of transforming growth factor by human blood after ozone treatment. **J. Biol. Regul., homeost** 8: 108-112, 1994.

BORGES, G. A., ELIAS, S. T., DA SILVA, S. M. M., MAGALHAES, P. O., MACEDO, S. B., RIBEIRO, A. P., GUERRA, E. N. S. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, p. 364-370, 2017.

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**, v. 35, p. 1111-1119, 1991.

BRINSKO, S. P., RIGBY, S. L., VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. In: **Proc Am Assoc Equine Pract.** v. 49 p. 363-365, 2003.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; SHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINKICHS, K.; HARTMAN, D. Manual of Equine Reproduction. 3 ed. **Elsevier**, p.190, 2011.

BUCCA, S., CARLI, A., BUCKLEY, T., DOLCI, G., FOGARTY, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, p. 1093-1100, 2008.

CADARIO, Maria E.; THATCHER, Marie-Joelle D.; LEBLANC, Michelle M. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 495-500, 1995.

CAMPBELL, M. L. H.; ENGLAND, G. C. W. A comparison of the ecbolic efficacy of intravenous and intrauterine oxytocin treatments. **Theriogenology**, v. 58, p. 473-477, 2002.

CANISSO, Igor F.; STEWART, Jamie; DA SILVA, Marco A. Coutinho. Endometritis: Managing persistent post-breeding endometritis. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 32, p. 465-480, 2016.

CANISSO, Igor F.; SEGABINAZZI, Lorenzo GTM; FEDORKA, Carleigh E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares-a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. **International journal of molecular sciences**, v. 21, , p. 1432, 2020.

CAUSEY, R. C., MILETELLO, T., O'DONNELL, L., LYLE, SK., PACCAMONTI, D. L., ANDERSON, K. J., ELITS, B. E., MORSE, B., LEBLANC, M. M. Pathologic Effects of Clinical Uterine Inflammation on the Equine Endometrial Mucosa. *American Association of Equine Parctitioners*, v. 54, p. 276-277, 2018.

CHRISTOFFERSEN, M., BRANDIS, L., SAMUELSSON, J., BOJESEN, A. M., TROEDSSON, M. H. T., PETERSEN, M. R. Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. **Theriogenology**, v. 83, p. 222-227, 2015.

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

DASCANIO, J. J. How and when to treat endometritis with systemic or local antibiotics. In: **Proceedings of the 57th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Antonio, Texas, USA, 18-22 November 2011**. American Association of Equine Practitioners (AAEP), p. 24-31, 2011.

DIEFFENBACHER A., POCKLINGTON W. D. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 1st Supplement to the 7th edition. International Union of Pure and Applied Chemistry. Applied Chemistry Division. Commission on oils, fats and derivatives. Oxford. **Blackwell Scientific publications**, 1992.

DU, Hongling; TAYLOR, Hugh S. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. **Stem cells**, v. 25, p. 2082-2086, 2007.

DURICIC, D., VALPOTIC, H., ZURA ZAIA, I., SAMARDZIJA, M. Comparison of intrauterine antibiotics versus ozone medical use in sheep with retained placenta and following obstetric assistance. **Reproduction in domestic animals**, v. 51, p. 538-540, 2016.

EISENBERG, Robert C.; DOBROGOSZ, Walter J. Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 93, p. 941-949, 1967.

ESCANDÓN, B. M., ESPINOZA, J. S., PEREA, F. P., QUITO, F., OCHOA, R., LÓPEZ, G. E., GALARZA, D. A., GARZÓN, J. P. 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, p. 2523-2528, 2020.

FERRIS, R. A.; MCCUE, P. M. The effects of dexamethasone and prednisolone on pituitary and ovarian function in the mare. **Equine veterinary journal**, v. 42, p. 438-443, 2010.

FERRIS, R. A.; BOHN, A.; MCCUE, P. M. Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. **Equine Veterinary Education**, v. 27, p. 316-322, 2015.

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

FIALA, S. M., PIMENTEL, C. A., MATTOS, A. L. G., GREFORY, R. M., MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v. 67, p. 556-562, 2007.

FRISO, A.M.; SEGABINAZZI, L.G.T.M.; CYRINO, M.; CORREAL, S.B.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; TEORO DO CARMO, M.; DELL'AQUA, J.A.; MIRÓ, J.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Periovalutary administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. **Theriogenology**, v. 138, p. 24-30, 2019.

FRONTOSO, R., DE CARLO, E., PASOLINE, M. P., VAN DER MEULEN, K., PAGNINI, U., LOVANE, G., DE MARTINO, L. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. **Research in veterinary science**, v. 84, p. 1-6, 2008.



GANAIÉ, B. A., JAPHETH, K. P., ALI, M., LONE, S. A., MIR, S. H., MALIK, T. A. An insight into the pathophysiology, preventive and treatment strategies of retained fetal membranes in bovines—a review. **J. Anim. Health Prod**, v. 6, p. 62-72, 2018.

GIGUÈRE, Steeve. Antimicrobial drug action and interaction: An introduction. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**, p. 1-10, 2013.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography, 1ed**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 258p, 2007.

GROVE, Joanna E.; BRUSCIA, Emanuela; KRAUSE, Diane S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem cells**, v. 22, p. 487-500, 2004.

GULMEN, S., KURTOGLU, T., METEOGLU, I., KAYA, S., OKUTAN, H. Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mediastinitis. **journal of surgical research**, v. 185, p. 64-69, 2013.

HEIL, B. A., THOMPSON, S. K., KEARNS, T. A., DAVOLLI, G. M., KING, G., SONES, J. L. Metagenetic characterization of the resident equine uterine microbiome using multiple techniques. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 111, 2018.

HEIL, Babiche A.; PACCAMONTI, Dale L.; SONES, Jenny L. Role for the mammalian female reproductive tract microbiome in pregnancy outcomes. **Physiological genomics**, v. 51, n. 8, p. 390-399, 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 veterinary journal**, v. 34, n. 2, p. 191-194, 2002.

JANIC B., UMSTEAD T. M., PHELPS D. S., FLOROS J. An *in vitro* cell model system for the study of the effects of ozone and other gaseous agents on phagocytic cells. **Journal of immunological Methods**, v. 272, p. 125-134, 2003.

JIANG, H. J., CHEN, N., CHEN, Z. Q., YIN, J., QIU, Z. G., MIAO, J., YANG, Z. W., SHI, D. Y., WANG, H. R., WANG, X. W., LI, J. W., YANG, D., JIN, M. Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 32, p. 324-333, 2019.

KNUTTI, B., PYCOCK, J. F., VAN DER WEIJDEN, G. C., KUPFER, U. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. **Equine veterinary education**, v. 12, p. 267-270, 2000.

LEAL JUNIOR, Haroldo Vargas. Ozonioterapia em Medicina Veterinária e perspectiva para uso em Reprodução Equina. **Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, Instituto Brasileiro de Formação Profissional, Ibvvet – Faculdade de Jaguariuna, Jaguariuna, 2012.**

LEBLANC, Michelle M. Persistent mating-induced endometritis. In: **Current therapy in equine medicine**. WB Saunders, p. 234-237, 2003.

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

LEBLANC, M.M. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and postmating-induced endometritis in the mare. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.21-27, 2010.

MELO, U.P.; PALHARES, M.S.; FERREIRA, C.; SILVA FILHO, J.M. Endometrite equina: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. **Revista CFMV**, Conselho Federal de Medicina Veterinária, Ano XIV, n. 45, p. 47-64, 2008

MOLEIRO J., MENÉNDEZ S., LEDEA O. E., DÍAZ M., DÍAZ W., FERNÁNDEZ L. A., LEZCANO I. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC-Cuba). Procedimiento para la obtención de aceites y grasas vegetales ozonizados y aplicación de estos productos con fines farmacêuticos y cosmetológicos. Patente Cubana, 2009.

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

NIELSEN, Jesper Moller. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, p. 510-518, 2005.

NIELSEN, J. M., NIELSEN, F. H., PETERSEN, M. R., DYREHOSPITAL, A. Diagnosis of equine endometritis—Microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility. **Pferdeheilkunde**, v. 28, p. 8-13, 2012.

OHTSUKA H., OGATA A., TERASAKI N., KOIWA M., KAWAMURA S. Changes in leukocytes population after autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 68 (2), p. 175-178, 2006.

OTTO, M. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. **Antimicrob. Pept. Hum. Dis.** p. 251-258, 2006.

OUF, S. A., MOUSSA, T. A., ABD-ELMEGEED, A. M., ELTAHLAMY, S. R. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 697-702, 2016.

DA FONTOURA PEREIRA, R. C., DE LA CÔRTE, F. D., BRASS, K. E., AZEVEDO, M. S., GALLIO, M., CANTARELLI, C., DAU, S. L., CEZAR, S. A., INKELMANN, M. A. Evaluation of three methods of platelet-rich plasma for treatment of equine distal limb skin wounds. **Journal of equine veterinary science**, v. 72, p. 1-7, 2019.

PYCOCK, J.F. Breeding management of the problem mare. In: SAMPER, J.C. et al. (Ed.) **Equine breeding management and artificial insemination**. USA: Elsevier, cap. 13, p.139 – 164, 2009.

RAJABI, O., SAZGARNIA, A., ABBASI, F., LAVEGH, P. The activity of ozonated olive oil against *Leishmania major* promastigotes. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 18, p. 915, 2015.

RINK, B. E., BEYER, T., FRENCH, H. M., WATSON, E., AURICH, C., DONADEU, F. X. The fate of autologous endometrial mesenchymal stromal cells after application in the healthy equine uterus. **Stem cells and development**, v. 27, p. 1046-1052, 2018.

ROBERTSON, S. A., CHIN, P. Y., FEMIA, J. G., BROWN, H. M. Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming. **Journal of reproductive immunology**, v. 125, p. 80-88, 2018.

RODRIGUEZ, J. S., HAN, S., NIELSEN, S., PEARSON, L. K., GAY, J. M., TIBARY A. Consequences of intrauterine enrofloxacin infusion on mare endometrium. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 106-111, 2012.

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

ROJER, H.; AURICH, C. Treatment of Persistent Mating-Induced Endometritis in Mares with the Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug Vedaprofen. *Reproduction in domestic animals*, v. 45, p. e458-e460, 2010.

RUA M. A. S., QUIRINO, C. R., RIBEIRO, R. B., CARVALHO, E. C. Q., BERNADINO, M. L. A., JUNIOR, A. B., CIPAGALTA, L. F. Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares. **Theriogenology**, v.114, p. 285-292, 2018.

SAMARDZIJA, M., TURK, R., SOBIECH, P., VALPOTIC, H., HARAPIN, I., GRACNER, D., DURICIC, D. Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: a review. **Veterinarski arhiv**, v. 87, p. 363-375, 2017.

SCHNOBRICH, M. R., PERASON, L. K., BARDER, B. K., BRADECAMP, E., TIBARY, A. Effects of intrauterine infusion of a water-based suspension of enrofloxacin on mare endometrium. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 662-667, 2015.

SCHWARTZ, Adriana. Ozone therapy in the treatment of recurrent vulvo-vaginitis by *Candida albicans*. **Ozone Therapy Global Journal**, v. 5, p. 99-107, 2015.

SCOGGIN, Charles F. Not just a number: effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in thoroughbred brood-mares. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, p. 872-879, 2015.

SCOGGIN, Charles F. Endometritis: nontraditional therapies. ***Veterinary Clinics: Equine Practice***, v. 32, p. 499-511, 2016.

SCROLLAVEZZA P., ABLONDI M., POGLIACOMI, B., GUARESCHI, D., DALL'AGLIO, R., POLDI, R., PEZZOLI, G. Ozone treatment in mastites, metrites and retention of fetal membranes in the cows. In: **Atti 2 Intern. Symp. Ozone Application, Havana, Cuba**. 1997.

SCROLLAVEZZA, P.; FERRARI, F.; MARTINI, F.M. et al. Ozone treatment and blood lactate variation after thoroughbred racehorses. **World Equine Veterinary Association Mondial Congress**, p.466, 1997.

SEGABINAZZI, Lorenzo G. et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. **Theriogenology**, v. 104, p. 120-126, 2017.

SÁNCHEZ, Gregorio Martínez et al. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. **Ozone Therapy Global Journal**, v. 2, n. 1, p. 121-139, 2012.

SILVA, R.A., J.E.G. GAROTTI, R.S. SILVA, A. NAVARINI, A. Jr PACHECO. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. **Acta Cir. Bras**, v.24, p.124-127, 2009.

Smith, N. L., Wilson, A. L., Gandhi, J., Vatsia, S., & Khan, S. A. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Medical gas research*, v. 7, p. 212, 2017.

STECKLER, D., NAIDOO, V., GERBER, D., KAHN, W. Ex vivo influence of carbetocin on equine myometrial muscles and comparison with oxytocin. **Theriogenology**, v. 78, p. 502-509, 2012.

STOUT, Tom AE. Fungal endometritis in the mare. **Pferdeheilkunde**, v. 24, n. 1, p. 83, 2008.

THANOMSUB, B., ANUPUNPISIT, V., CHANPHETCH, S., WATCHARACHAIPONG, T., POONKHUM, R., SRISUKONTH, C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 48, p. 193-199, 2002.

THORGERSEN, E. B., PHARO, A., HAVERSON, K., AXELSEN, A. K., GAUSTAD, P., KOTWAL, G. J., SFYROERA, G., MOLLNES, T. E. Inhibition of complement and CD14 attenuates the Escherichia coli-induced inflammatory response in porcine whole blood. **Infection and immunity**, v. 77, p. 725-732, 2009.

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

USP 35 NF 20 Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulário Nacional. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, EUA, 2012.

VANDERWALL, Dirk K.; WOODS, Gordon L. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, p. 1108-1110, 2003.

VIGLINO, G.C. Ozonioterapia Aplicada a Equinos. São Paulo: **Associação Brasileira de Ozonioterapia**, p.6, 2008.

WALTER, J., NEUBERG, K. P., FAILING, K., WEHREND, A. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. **Animal reproduction science**, v. 132, p. 178-186, 2012.

WATSON, E.D. Post-breeding endometritis in the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.221-232, 2000.

WOODWARD, E. M., CHRISTOFFERSEN, M., CAMPOS, J., SQUIRES, E. L., TROEDSSON, M. H. T. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare:

relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**, v. 78, p. 495-501, 2012.

ZARGARAN, Mahdis; FATAHINIA, Mahnaz; MAHMOUDABADI, A. Zarei. The efficacy of gaseous ozone against different forms of *Candida albicans*. **Current medical mycology**, v. 3, p. 26, 2017.

ZOBEL, R., MARTINEC, R., IVANOVIC, D., ROSIC, N., STANCIC, Z., ZERJAVIC, I., FLAJSIG, B., PLAVEC, H., SMOLEC, O. Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle. **Veterinarski arhiv**, v. 84, p. 1-8, 2014.

## **CAPÍTULO 2**



## 1 RESUMO

### OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS

Ana Caroline Araújo Ávila<sup>1</sup>, Rodrigo Arruda de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia e Veterinária – UnB, DF

Objetivou-se com esse estudo avaliar se a ozonioterapia intrauterina em éguas pode ser usada como alternativa de tratamento para os casos de endometrite, pois este apresenta ação antimicrobiana, promove melhora sobre o sistema imunitário, é um tratamento de baixo custo e não acarreta resistência bacteriana. Vinte e cinco animais com histórico reprodutivo conhecido foram divididos em três grupos de forma balanceada, levando em consideração a idade e o histórico de infertilidade e inflamação uterina, previamente avaliada através de citologia para avaliação de polimorfonucleados e *swab* uterino para avaliação de cultura microbiológica de fungos e bactérias. O grupo controle G1 (n=7) recebeu o tratamento de lavagem uterina com soro ringer lactato sem a utilização do Ozônio; o grupo G2 (n=9) recebeu o tratamento de infusão direta de gás ozônio intrauterino, na concentração de 40mcg durante 10 minutos; e o grupo G3 (n=9) recebeu o tratamento com infusão intrauterina de óleo de girassol ozonizado. Os exames de citologia e *swab* uterino foram coletados antes e após os tratamentos para a avaliação dos resultados. Observou-se nos resultados obtidos no exame de cultura pós-tratamento que para o G1 57% (4/7) dos animais mantiveram a infecção uterina; enquanto 89% (8/9) e 78% (7/9) obtiveram resultado negativo para crescimento de microrganismos, em G2 e G3 respectivamente. Não houve diferença estatística para cultura uterina entre os grupos ( $P>0,05$ ). Na citologia uterina foi obtida uma média de neutrófilos/campo nos grupos G1, G2 e G3, respectivamente de:  $9,14 \pm 3,02$  para  $7,71 \pm 3,59$ ;  $10,67 \pm 3,84$  para  $2,89 \pm 3,59$ ;  $6,44 \pm 2,79$  para  $6,55 \pm 7,18$ . Não houve diferença estatística entre os grupos na citologia após tratamento ( $P>0,05$ ). Conclui-se que os tratamentos são eficazes contra a endometrite em éguas.

Palavras-chave: bactéria, equino, fungo, infecção uterina, ozônio, terapia.

## 2 ABSTRACT

### OZONIOTHERAPY IN THE TREATMENT OF ENDOMETRITIS IN MARES

Ana Caroline Araújo Ávila<sup>1</sup>, Rodrigo Arruda de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Agronomy and Veterinary Medicine – UnB, DF

The objective of this study was to evaluate whether intrauterine ozone therapy in mares can be used as an alternative treatment for cases of endometritis, as it has antimicrobial action, promotes improvement on the immune system, is a low-cost treatment and does not cause bacterial resistance. Twenty-five animals with a known reproductive history were divided into three groups in a balanced way, taking into account age and history of infertility and uterine inflammation, previously assessed through cytology and uterine swab. The G1 control group (n = 7) treatment of uterine lavage with ringer lactate serum without the use of Ozone; the G2 group (n = 9) treatment of direct intrauterine ozone gas infusion, at a concentration of 40mcg for 10 minutes; and group G3 (n = 9) treatment with intrauterine infusion of ozonated sunflower oil. The cytology and uterine swab exams were collected before and after treatments to evaluate the results. It was observed the results obtained in the post-treatment culture exam that for G1 57% (4/7) of the animals maintained the uterine infection; while 89% (8/9) and 78% (7/9) obtained negative results for the growth of microorganisms, in G2 and G3 respectively. There was no statistical difference for uterine culture between the groups ( $P > 0.05$ ). In uterine cytology, an average of neutrophils / fields was obtained in groups G1, G2 and G3, respectively:  $9.14 \pm 3.02$  to  $7.71 \pm 3.59$ ;  $10.67 \pm 3.84$  to  $2.89 \pm 3.59$ ;  $6.44 \pm 2.79$  to  $6.55 \pm 7.18$ . There was no statistical difference between groups in cytology after treatment ( $P > 0.05$ ). It is concluded that the treatments are effective against endometritis in mares.

Keywords: bacteria, equine, fungus, uterine infection, ozone, therapy.

### 3 INTRODUÇÃO

Das afecções que acometem o sistema reprodutivo, a endometrite é a maior causa de infertilidade nas éguas (Brinsko et al., 2011), sendo apontada como a terceira afecção clínica mais comum depois da cólica e das afecções do trato respiratório (Troedson, 1999). A infertilidade e o percentual alto de abortos acarretam grandes prejuízos para médicos veterinários e para criadores de equinos (LeBlanc & Causey, 2009). A endometrite é um processo inflamatório e/ou infeccioso, porém, quando tal inflamação persiste, torna o ambiente uterino inóspito ao conceito, podendo reduzir o potencial da fertilidade da égua (Pycock, 2009).

O útero da égua é exposto a uma grande variedade de microorganismos durante o processo de cobertura e pelo aumento das biotécnicas utilizadas na reprodução. Clinicamente, as éguas são divididas em resistentes ou em susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura (Troedson, 1999); os animais que conseguem eliminar os patógenos dentro de 48H por meio de mecanismos de defesa uterina após a cobertura ou inseminação artificial, são resistentes e apresentam uma boa fertilidade; aquelas que possuem falha neste mecanismo de limpeza são consideradas susceptíveis, uma inflamação persistente promove altas concentrações de prostaglandina, resultando em luteólise precoce, diminuição de progesterona e consequente perda embrionária (Adans et al., 1987) e, pode desenvolver uma endometrite pós-cobertura ou uma endometrite aguda, e se esta não for tratada poderá se tornar crônica (LeBlanc, 2010).

Recentemente, o foco das pesquisas no ramo de patologia endometrial equina tem sido de buscar associações entre alterações e doenças uterinas com os mecanismos celulares e moleculares. Essas pesquisas ajudam a elucidar ainda mais sobre a patogênese das desordens endometriais e, pode contribuir para o desenvolvimento de regimes profiláticos efetivos e outras opções de tratamento (Schöniger & Schoon, 2020).

A ozonioterapia é um possível novo tratamento para éguas, e já vem sendo amplamente utilizada na medicina humana na Europa, na Ásia e em Cuba (Scrollavezza et al., 1997). Além de ativar o metabolismo eritrocitário e das células imunes (Silva et al., 2009), o principal efeito fisiológico da ozonioterapia é sua ação antimicrobiana. O ozônio atua oxidando os microrganismos quer sejam fungos, vírus ou bactérias. Estes microrganismos são altamente susceptíveis à oxidação uma vez que não possuem um sistema protetor contra a oxidação como os mamíferos (Viglino, 2008). Além de possuir ação antimicrobiana, também possui um grande potencial para melhorar o sistema imune, não acarretar resistência bacteriana, além de ser um tratamento de baixo custo. A hipótese do presente estudo foi de que a ozonioterapia possa ser eficaz no tratamento de éguas com histórico reprodutivo de infertilidade e subfertilidade.

Dessa forma, objetivou-se com esse estudo avaliar se a ozonioterapia intrauterina em éguas pode ser usada como um possível tratamento para os casos de endometrite, avaliar seu efeito sobre a população microbiana e sobre a dinâmica dos polimorfonucleados.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Este projeto foi aprovado pelo CEUA- UNB sob o nº 23106.068932/2018-12.

### **4.1 Animais**

Foram utilizadas vinte e cinco éguas das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, cujas idades variaram de cinco e dez anos e pesavam entre 350 e 500kg. Os animais se encontram em haras e fazendas dos estados de Distrito Federal e Goiás. Todos os animais estavam em criação extensiva.

As éguas foram selecionadas pelo seu histórico reprodutivo. Animais que apresentavam quadros de infertilidade, baixa fertilidade, dificuldade para prenhez, baixo percentual de colheitas positivas de embrião e presença de líquido uterino purulento ou não foram encaminhadas a uma seção de exames uterinos para serem selecionadas para o experimento. Apenas éguas que apresentaram cultura microbiológica positiva para bactérias e fungos foram incluídas no experimento.

### **4.2 Delineamento experimental**

As 25 éguas selecionadas foram acompanhadas durante três cios consecutivos, grupadas aleatoriamente e submetidas a três tratamentos. Primeiramente, foi realizado a palpação retal com acompanhamento ultrassonográfico para a identificação do início do estro

das éguas. Os animais identificados no cio foram contidos adequadamente no tronco de contenção. A higienização da vulva foi realizada com clorexidina, sendo esse processo de lavagem repetido quantas vezes fosse necessário até que a região perineal estivesse limpa. O tratamento era iniciado quando se identificava útero com edema no mínimo 2 (de uma escala de 0 a 5, segundo Ginther (2007)).

No primeiro cio foi realizada coleta de material biológico para cultura microbiológica (*swab*) e citológica (escova ginecológica) (fase de seleção). Durante o segundo cio realizou-se os tratamentos (fase de tratamento) e no terceiro cio foi realizada coleta de material biológico para cultura microbiológica (*swab*) e citológica (escova ginecológica) para avaliação da resposta aos tratamentos (fase de avaliação da resposta do tratamento). As éguas que apresentaram cultura positiva foram separadas em três grupos: grupo tratamento controle (G1) – lavagem uterina com solução ringer lactato; Grupo tratamento 2: éguas que receberam o tratamento com infusão intrauterina de gás ozonizado e grupo tratamento 3: éguas que receberam o tratamento com infusão intrauterina de óleo de girassol ozonizado (Olezon<sup>®</sup>).

No grupo controle (G1) foi realizada apenas a lavagem uterina com soro ringer lactato e com uma posterior aplicação via intramuscular de 20 UI de ocitocina (Ocitocina Forte UCB, São Paulo, Brasil). No grupo tratamento 1 (G2), após a lavagem uterina foi realizada a infusão direta do gás ozonizado no útero com o auxílio de uma pipeta de inseminação para equinos (PROVAR, São Paulo, Brasil) e de um equipo na concentração de 40 mcg com duração de 10 minutos. Esse procedimento foi repetido por dois dias consecutivos, e com uma posterior aplicação via intramuscular de 20 UI de ocitocina no segundo dia (Ocitocina Forte UCB, São Paulo, Brasil).

No grupo tratamento 2 (G3), após a lavagem uterina foi realizado a infusão de 50 mL de óleo de girassol ozonizado com o auxílio da pipeta de inseminação para equinos (PROVAR, São Paulo, Brasil) e após a infusão o útero foi massageado por palpação transretal. Depois de 24 horas da infusão foi realizado uma lavagem uterina com soro ringer lactato até que se obtivesse um lavado totalmente limpo, e com uma posterior aplicação via intramuscular de 20 UI de ocitocina (Ocitocina Forte UCB, São Paulo, Brasil).

### 4.3 Exames de cultura e citologia

A cultura foi realizada durante o estro das éguas com a utilização de um coletor estéril descartável para equinos (PROVAR, São Paulo, Brasil), com *swab* em sistema de dupla proteção, a fim de evitar contaminações durante sua passagem pela cavidade vaginal da égua. Com a mão devidamente enluvada e circundando a extremidade do coletor entre o polegar e a palma da mão, foi introduzido pela vagina até atingir a cérvix, onde se rompeu a camisa sanitária e o *swab* foi exposto entrando em contato com a mucosa uterina e suas secreções. Realizou-se movimentos circulatorios com o *swab*, ele permaneceu em contato com a mucosa uterina por 40 segundos para a absorção do muco. Na retirada, o *swab* era puxado para dentro da proteção do coletor para que fosse retirado da vagina (Cocchia et al., 2012). Em seguida, o *swab* foi desacoplado do coletor e, posteriormente acoplado no tubo contendo o meio de cultivo *Stuart* próprio para transporte. Este foi refrigerado a 5° Celsius e enviado para o laboratório (Rua et al., 2018).

A citologia uterina foi realizada como da mesma forma descrita acima, como descrito por Rue et al. (2018), porém utilizou-se um coletor com escova citológica estéril e descartável para equinos (PROVAR, São Paulo, Brasil). Após a realização do procedimento de coleta do material e retirada do coletor de dentro da égua, era realizado movimentos de rolamento com a escova citológica em uma lâmina histológica para deposição do material uterino coletado e fixado com álcool 70°. Após a secagem, as lâminas foram coradas com panóptico rápido, enviadas para o laboratório e analisadas com microscópio óptico. A contagem de células foi realizada de acordo com Cocchia et al. (2012).

### 4.4 Análise estatística

O conjunto de dados gerados foi submetido à análise de crítica e consistência utilizando-se o procedimento teste de distribuição normal do pacote computacional WinSTAT®. Como as variáveis não apresentaram distribuição normal de probabilidade, não atendendo, portanto, a premissa básica da análise de variância paramétrica, optou-se então pela análise não paramétrica utilizando-se o teste H de Kruskal-Wallis.

## 5. RESULTADOS

Dentre os agentes etiológicos encontrados no útero no exame de cultura microbiológica pré-tratamento observamos que 48% dos exames foram positivos para *Escherichia coli*; 24% positivo para *Aspergillus spp.*; 12% positivo para *Streptococcus sp.* e *Staphylococcus aureus*; e 4% positivo para *Cândida spp.* (Figura 1). Já com base nos resultados obtidos no exame de cultura pós-tratamento, no G1 57% (4/7) dos animais mantiveram a infecção uterina; no G2 89% (8/9) dos animais não foram observados crescimento de agentes etiológicos e 11% (1/9) dos animais se mantiveram com exame de cultura positivo; no G3 78% (7/9) obtiveram resultado negativo para crescimento dos microrganismos e 22% (2/9) se mantiveram positivos.

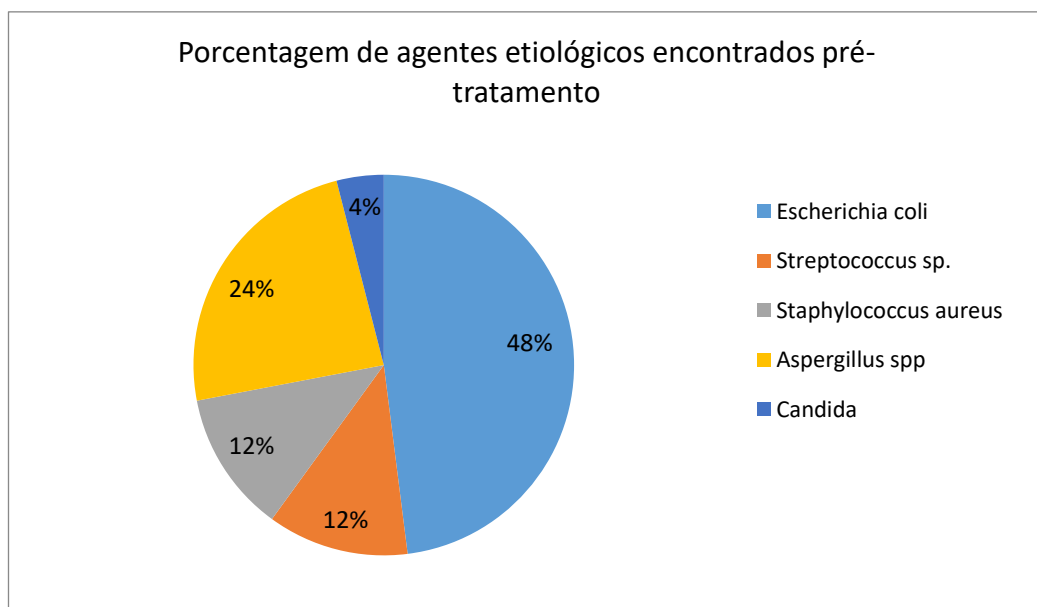


Figura 1: Porcentagem dos agentes etiológicos encontradas no exame de cultura microbiológica no pré-tratamento: 48% *Escherichia coli*, 24% *Aspergillus spp.*, 12% *Staphylococcus aureus*, 12% *Streptococcus sp.* e 4% *Cândida*.



Não houve diferença nos resultados de cultura uterina entre os tratamentos ( $p>0,05$ ) (Figura 2).

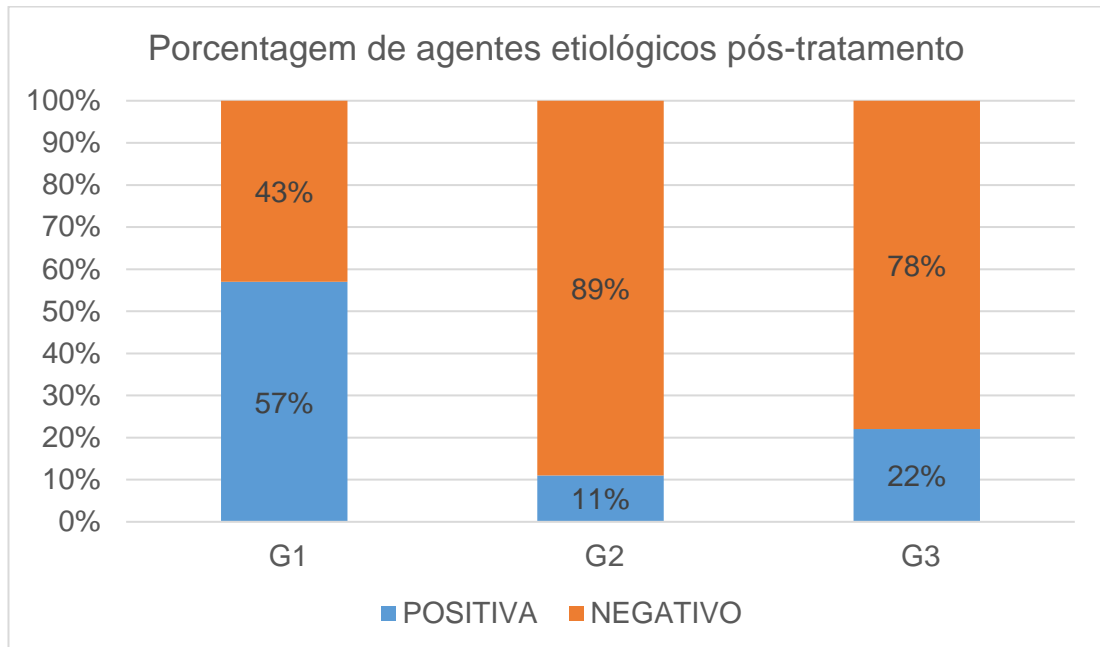


Figura 2: Porcentagem de eficácia no combate aos agentes etiológicos no exame de cultura microbiológica no pós-tratamento. Tratamento G1 57% manteve cultura positiva e 43% negativa, no tratamento G2 89% obteve cultura negativa e 11% se manteve positiva, no tratamento G3 78% obteve cultura negativa e 22% se manteve positiva.

De acordo com os exames de citologia uterina pré e pós-tratamento foram observadas a média de neutrófilos/campo nos tratamentos G1, G2 e G3, respectivamente de:  $9,14 \pm 3,02$  para  $7,71 \pm 3,59$ ;  $10,67 \pm 3,84$  para  $2,89 \pm 3,59$ ; e  $6,44 \pm 2,79$  para  $6,55 \pm 7,18$ . (Figura 3).

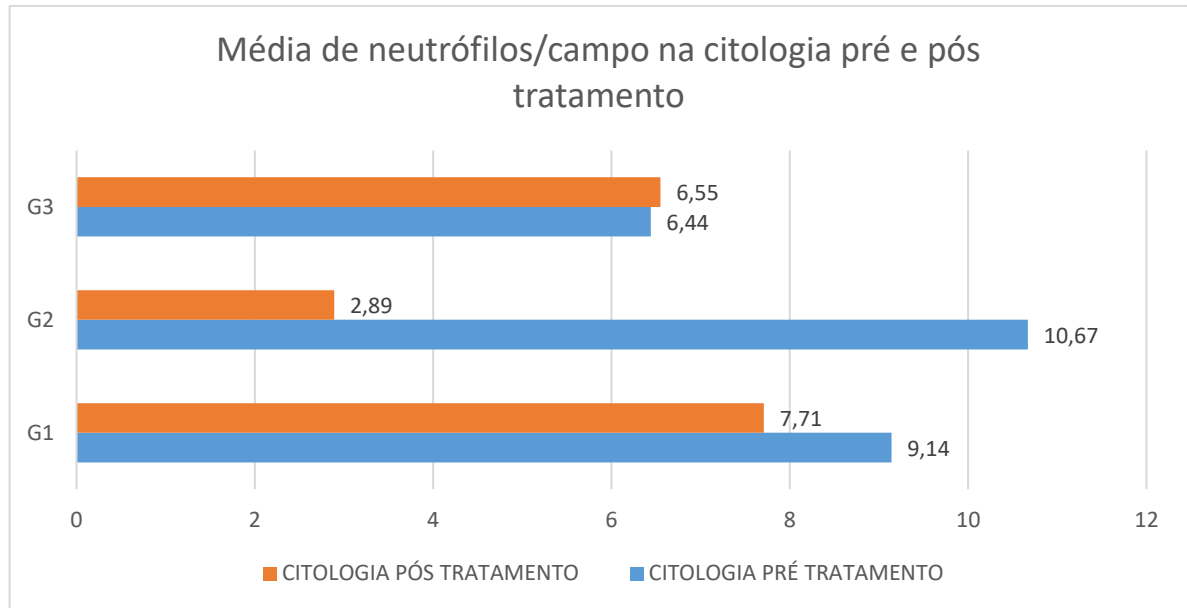


Figura 3: Média do número de neutrófilos/campo encontradas no exame de citologia pré e pós tratamento, respectivamente: G1 9.14 para 7.71, G2 10.67 para 2.89 e G3 6.44 para 6.55.

Em relação a percentagem de neutrófilos na citologia uterina antes e após tratamento obtivemos como resultado, respectivamente, 57,14% (4/7) entre 7,5-10 neutrófilos para 42,86% (3/7) entre 5-10 neutrófilos no grupo G1, 44,44% (4/9) entre 7,5-10 neutrófilos para 77,78% (7/9) entre 0-5 neutrófilos no grupo G2; e 55,56% (5/9) entre 5-7,5 neutrófilos para 44,44% (4/9) entre 5-10 neutrófilos no grupo G3. Não houve diferença entre os grupos tratamento na citologia após tratamento ( $p > 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Com relação a cultura uterina 89% e 78% dos animais do G2 e G3, respectivamente, o tratamento de ozônio foi eficaz contra os agentes etiológicos (fungos e bactérias). Confirmando assim a ação do ozônio contra os microrganismos presentes no útero, como foi mostrado por Rodriguez et al. (2018), que a ação oxidante do O<sub>3</sub> leva à destruição das paredes bacterianas e das membranas citoplasmáticas de fungos, além de agir contra os protozoários e vírus; por Zargarán et al. (2017) que comprovaram a ação do ozônio contra a levedura de *Candida albicans*; e por Thanomsub et al. (2002) que demonstraram as mudanças estruturais causadas em bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), por exposição ao ozônio, sendo essas bactérias também encontradas no útero das éguas deste estudo como causadoras da endometrite bacteriana antes do tratamento.

Apenas 11% e 22% dos animais do G2 e G3 respectivamente, se mantiveram positivos após tratamento. Foi notado que os agentes etiológicos que se mantiveram presentes após o tratamento desses animais, ficaram mais sensíveis aos antibióticos aos quais, antes do tratamento, eram resistentes. Mostrou-se que a infecção não foi totalmente erradicada, mas que houve a ação do ozônio sobre esses microrganismos; como também foi mostrado no estudo de Stange et al. (2019), que devido a sua atividade antimicrobiana, o O<sub>3</sub> é útil para prevenir a propagação de bactérias resistentes aos antibióticos (ARB) e genes de resistência a antibióticos (ARGs), e demonstraram que, mesmo em uma baixa concentração de 1 mg/L, O<sub>3</sub> removeu mais de 99% dos ARB e ARGs.

No tratamento G3, após a infusão do óleo ozonizado os animais manifestaram certo desconforto no qual a cauda se manteve elevada se assemelhando com a postura de micção durante alguns minutos, logo voltando à normalidade. Os lavados uterinos realizados 24h após esse tratamento obtiveram um recuperado com presença de grumos e mucos em éguas que possuíam tortuosidade cervical, semelhante com o que visualizamos no estudo de tratamento uterino com realizado com querosene; concluíram que a infusão de querosene não afeta a saúde

da égua e não mostrou sinais de aumento de fibrose e degeneração uterina pela avaliação histológica (Podico et al., 2020).

Sobre os resultados encontrados no exame de cultura uterina no grupo controle, 57% dos animais se mantiveram com infecção uterina e em 43%, não houve crescimento de agentes etiológicos, o que mostra que em alguns casos a lavagem uterina é eficaz. Como também afirma Knutti et al. (2000), a lavagem uterina com posterior aplicação de ocitocina ajuda a remover microrganismos, detritos, células inflamatórias e espermatozoides mortos do lúmen, pois estes podem ser prejudiciais para o embrião após a cobertura e para os espermatozoides antes da cobertura. Entretanto, a lavagem uterina realizada no G1 pode não ter retirado todos os microrganismos infecciosos presentes no útero, pois alguns podem se manter no biofilme como afirma Zargarán et al. (2017), o tratamento não faz remoção completa dos biofilmes de *Candida albicans* mesmo após 60 min de exposição; ou mantem-se em camadas mais profundas. Porém, o grupo controle obteve uma diminuição dos agentes etiológicos e o *swab* uterino não foi capaz de atingir partes uterinas que possam ter permanecido contaminadas, pois o método utilizado para coleta de material uterino com o *swab* não abrange o útero como um todo, o que pode ocasionar falsos negativos. Como afirma os estudos, a cultura uterina com o *swab* é menos sensível quando comparada com a biópsia (Nielsen, 2005) e com o lavado uterino de baixo volume. Contudo, a especificidade do lavado uterino de baixo volume (0,72) foi menor quando comparado com as outras duas técnicas (*swab* 0,90; biópsia 0,90) (Christoffersen et al., 2015).

Os agentes etiológicos mais encontrados nesse estudo foram: *Escherichia coli*, *Aspergillus sp.* e *Streptococcus sp.*, condizendo com o trabalho que diz que a endometrite infecciosa pode ocorrer na presença de bactérias e/ou fungos. As bactérias mais comumente isoladas são *Streptococcus*, Coliformes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Canisso et al., 2016). LeBlanc & Magsig & Stromberg (2007) encontraram em seu estudo a predominância da *E. coli* (42,2%) seguido do *Streptococcus* (37,6%). Já os fungos mais usualmente isolados são *Aspergillus* e *Candida*, mas outras espécies menos comuns podem ser encontradas como o *Mucor sp* (Beltaire et al., 2012).

O exame de citologia apresentou-se dentro do esperado de acordo com o período de coleta. No processo inflamatório, diminui a resposta inflamatória com a observação da queda do número de neutrófilos por campo, onde a média do resultado da citologia no grupo A teve um decréscimo significativo após tratamento, mostrando este ser eficaz para o controle da inflamação. Porém, muitos estudos têm revelado que o O<sub>3</sub> estimula um número de células do sistema imune (Sháñez et al., 2012). Já outros estudos demonstraram que essa ação varia de

acordo com a concentração utilizada, com o estado inicial da célula e do animal tratado. Como mostrado no estudo de Janic et al. (2003) os resultados demonstraram que os animais com processos inflamatórios obtiveram uma redução significativa dos linfócitos com receptores CD-14 e um aumento da relação CD4/CD8 em comparação com os animais considerados saudáveis. O que confirma o resultado encontrado nesse estudo e podemos sugerir que o ozônio aplicado em animais com processos inflamatórios, foi capaz de modular a resposta inflamatória.

Uma pesquisa feita com vacas demonstrou que o gás ozonizado utilizado no pós-parto como tratamento preventivo apresentou-se eficaz para melhorar a fertilidade das vacas Simental (Zobel et al., 2014). O que também pode ser observado durante o nosso experimento, onde o gás ozonizado foi capaz de agir no processo inflamatório e infeccioso tornando o útero um ambiente apto e adequado para o desenvolvimento de futuras gestações. Em outro estudo realizado no pós-parto de vacas com endometrite subclínica foi observada uma redução das células de defesa melhorando o desempenho reprodutivo destes animais (Escandón et al., 2020).

No G2, não houve diminuição da média de neutrófilos se mantendo igual antes e após o tratamento. Este pode ser eficaz para debelar a infecção como afirma o estudo, os compostos peroxídicos são os responsáveis pela ação fungicida do Olezon® tópico (USP, 2012), esses ácidos carboxílicos contribuem para a ação biológica do medicamento ao modificar o pH intra e extracelular e com ele se transformam os processos de troca em membranas dos microrganismos (Rodríguez et al., 2018). Mas esse tratamento acarreta um aumento das células inflamatórias, o que pode condizer com o estudo que diz que a terapia intrauterina com ozônio demonstrou ter propriedades como imuno estimulador, imuno modulador e anti-inflamatório (Ganaie et al. 2018). Podendo então estimular ou modular o sistema imune de acordo com o estado inicial do animal, tipo de tratamento e concentração do O<sub>3</sub>. Além de que, a endometrite não infecciosa também leva a quimiotaxia de neutrófilos para o lúmen uterino, por isso esse exame isolado não deve ser utilizado para descartar a endometrite infecciosa. Assim sendo, amostras de cultura uterina sempre devem ser colhidas e avaliadas juntamente com a citologia (Canisso et al., 2020). No entanto, é provável que o tratamento com ozônio forneceu um ambiente uterino mais favorável para inseminação, fertilização e desenvolvimento inicial do embrião, reduzindo as condições inflamatórias adversas do útero (Samardžija et al., 2017).

Já o grupo controle não houve diferença significativa no número de polimorfonucleares por campo. O que não corrobora com Canisso et al. (2020) que afirmam que a lavagem uterina pode reintroduzir neutrófilos viáveis para restabelecer a degradação dos microrganismos, nos casos onde haja uma estagnação do estado inflamatório.

Sugere-se que o O<sub>3</sub> possa ser utilizado juntamente com outros tipos de terapias a fim de intensificar o resultado obtido, como afirma Borges et al. (2017), quando combinado com clorexidina em feridas, observa-se a potencialização da ação do O<sub>3</sub> na atividade antibacteriana e antifúngica.

Desse modo, a ozonioterapia pode ser utilizada de maneira preventiva e não apenas como tratamento, como já foi comprovado em estudos realizados em vacas, onde a ozonioterapia mostrou resultados promissores no tratamento de distúrbios puerperais em vacas, cabras e ovelhas como alternativa no uso de antibióticos. Na verdade, a ozonioterapia provou ser mais eficaz do que a terapia alopática, melhorando o aspecto fisiológico da regressão uterina (Đuričić et al. 2016).

## 7. CONCLUSÃO

Nesse estudo podemos perceber que como qualquer outro tratamento, o resultado da ozonioterapia pode sofrer grande interferência de acordo com cada animal. Por isso o tempo de tratamento e a concentração de O<sub>3</sub> devem ser mais estudadas para diferentes tipos de infecções de diferentes históricos reprodutivos individuais de cada animal. Conclui-se que os três tratamentos são eficazes.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANS, G. P., KASTELIC, J. P., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. The Effect of uterine inflammation and ultrasonically detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 445-454, 1987.

BELTAIRE, Katherine A.; CHEONG, Soon Hon; COUTINHO DA SILVA, M. A. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999–2011). **Equine veterinary journal**, v. 44, p. 84-87, 2012.

BORGES, G. A., ELIAS, S. T., DA SILVA, S. M. M., MAGALHAES, P. O., MACEDO, S. B., RIBEIRO, A. P., GUERRA, E. N. S. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, p. 364-370, 2017.

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**, v. 35, p. 1111-1119, 1991.



CANISSO, Igor F.; SEGABINAZZI, Lorenzo GTM; FEDORKA, Carleigh E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares-a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. **International journal of molecular sciences**, v. 21, p. 1432, 2020.

CANISSO, Igor F.; STEWART, Jamie; DA SILVA, Marco A. Coutinho. Endometritis: Managing persistent post-breeding endometritis. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 32, p. 465-480, 2016.

CHRISTOFFERSEN, M., BRANDIS, L., SAMUELSSON, J., BOJESEN, A. M., TROEDSSON, M. H. T., PETERSEN, M. R. Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. **Theriogenology**, v. 83, p. 222-227, 2015.

COCCHA 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**, v.77, p.89-98, 2012.

DURICIC, D., VALPOTIC, H., ZURA ZAIA, I., SAMARDZIJA, M. Comparison of intrauterine antibiotics versus ozone medical use in sheep with retained placenta and following obstetric assistance. **Reproduction in domestic animals**, v. 51, p. 538-540, 2016.

ESCANDÓN, B. M., ESPINOZA, J. S., PEREA, F. P., QUITO, F., OCHOA, R., LÓPEZ, G. E., GALARZA, D. A., GARZÓN, J. P. 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, p. 2523-2528, 2020.

GANAIE, B. A., JAPHETH, K. P., ALI, M., LONE, S. A., MIR, S. H., MALIK, T. A. An insight into the pathophysiology, preventive and treatment strategies of retained fetal membranes in bovines—a review. **J. Anim. Health Prod**, v. 6, p. 62-72, 2018

JANIC B., UMSTEAD T. M., PHELPS D. S., FLOROS J. An *in vitro* cell model system for the study of the effects of ozone and other gaseous agentes on phagocytic cells. **Journal of immunological Methods**, v.272, p. 125-134, 2003.

KNUTTI, B. et al. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. **Equine veterinary education**, v. 12, p. 267-270, 2000.

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

LEBLANC, M.M. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and postmating-induced endometritis in the mare. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.21-27, 2010.

NIELSEN, Jesper Moller. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, p. 510-518, 2005.

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.

PYCOCK, J.F. Breeding management of the problem mare. In: SAMPER, J.C. et al. (Ed.) **Equine breeding management and artificial insemination**. USA: Elsevier, cap. 13, p.139 – 164, 2009.

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

RUA M. A. S., QUIRINO, C. R., RIBEIRO, R. B., CARVALHO, E. C. Q., BERNADINO, M. L. A., JUNIOR, A. B., CIPAGALTA, L. F. Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares. **Theriogenology**, v.114, p. 285-292, 2018.

SAMARDZIJA, M., TURK, R., SOBIECH, P., VALPOTIC, H., HARAPIN, I., GRACNER, D., DURICIC, D. Intrauterine ozone treatment of puerperal disorders in domestic ruminants: a review. **Veterinarski arhiv**, v. 87, p. 363-375, 2017.

SÁNCHEZ, Gregorio Martínez et al. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. **Ozone Therapy Global Journal**, v. 2, p. 121-139, 2012.

SCHÖNIGER, S., SCHOON, H. A. The Healthy and Diseased Equine Endometrium: A Review of Morphological Features and Molecular Analyses. **Animals**, v. 10, p. 625, 2020.

SCROLLAVEZZA P., ABLONDI M., POGLIACOMI, B., GUARESCHI, D., DALL'AGLIO, R., POLDI, R., PEZZOLI, G. Ozone treatment in mastites, metrites and retention of fetal membranes in the cows. In: **Atti 2 Intern. Symp. Ozone Application, Havana, Cuba**. 1997.

SILVA, R.A., J.E.G. GAROTTI, R.S. SILVA, A. NAVARINI, A. Jr PACHECO. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. **Acta Cir. Bras**, v.24, p.124-127, 2009.

STANGE, C. et al. Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 222, p. 541-548, 2019.

THANOMSUB, B., ANUPUNPISIT, V., CHANPHETCH, S., WATCHARACHAIPONG, T., POONKHUM, R., SRISUKONTH, C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 48, p. 193-199, 2002.

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

USP 35 NF 20 Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulário Nacional. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, EUA, 2012.

VIGLINO, G.C. Ozonioterapia Aplicada a Equinos. São Paulo: **Associação Brasileira de Ozonioterapia**, p.6, 2008.

WATSON, E.D. Post-breeding endometritis in the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.221-232, 2000.

ZARGARAN, Mahdis; FATAHINIA, Mahnaz; MAHMOUDABADI, A. Zarei. The efficacy of gaseous ozone against different forms of *Candida albicans*. **Current medical mycology**, v. 3, p. 26, 2017.

ZOBEL, R., MARTINEC, R., IVANOVIC, D., ROSIC, N., STANCIC, Z., ZERJAVIC, I., FLAJSIG, B., PLAVEC, H., SMOLEC, O. Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle. **Veterinarski arhiv**, v. 84, p. 1-8, 2014