



## Efecto de la aplicación intrauterina de ozono sobre la migración de neutrófilos y la endometritis subclínica en ganado lechero



Jessica Bárbara González-Aguado <sup>a</sup>

Elisa Ochoa-Estrada <sup>b</sup>

Héctor Raymundo Vera-Ávila <sup>a</sup>

Ma. de Jesús Chávez-López <sup>a,c</sup>

Mario Alfredo Espinosa-Martínez <sup>b</sup>

Germinal Jorge Cantó-Alarcón <sup>a</sup>

Claudia Gutiérrez-García <sup>d</sup>

Luis Javier Montiel-Olguín <sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales, Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable. Av. de las Ciencias s/n, 76230, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CENID Fisiología y Mejoramiento Animal. Querétaro, México.

<sup>c</sup> Universidad Autónoma de Querétaro. Centro de Extensión e Innovación Regional AC. Querétaro, México.

<sup>d</sup> Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias. Querétaro, México.

\* Autor de correspondencia: [montiel.luis@inifap.gob.mx](mailto:montiel.luis@inifap.gob.mx)

### Resumen:

El objetivo fue determinar si una solución salina ozonizada (SSO3) incrementa los neutrófilos polimorfonucleares (NPMN) endometriales (Exp 1) y desafiar el efecto preventivo de SSO3 sobre la endometritis subclínica (ESC) (Exp 2). En el Exp 1 se utilizaron 38 vacas Holstein primíparas. Se incluyeron vacas con (CAM) y sin

antecedentes de metritis postparto (SAM); posteriormente se repartieron en subgrupos control (CTRL, solución salina) o SSO3 ( $6.7 \pm 0.3$  ppm). A los 55 días postparto se aplicó 50 ml de CTRL o SSO3 intrauterinamente y a las 48 h se registró la cantidad de NPMN por citología endometrial. En el Exp 2 se utilizaron 26 vacas Holstein primíparas SAM. Las vacas se repartieron aleatoriamente en CTRL o SSO3. Se administraron dos dosis de 50 ml con intervalo de 7 días (primera aplicación  $11.3 \pm 0.4$  días postparto). Al día 30 postparto se diagnosticó ESC ( $\geq 6\%$  NPMN). Las vacas CAM tuvieron mayor número de NPMN endometriales comparado con vacas SAM ( $13.9 \pm 6.2$  vs  $1.0 \pm 0.46$ ,  $P < 0.05$ ). El grupo CAM-CTRL presentó mayor número de NPMN que el SAM-CTRL ( $17.0 \pm 9.6$  vs  $0.1 \pm 0.1$ ,  $P < 0.05$ ) mientras que los grupos CAM-SSO3 y SAM-SSO3 ( $10.4 \pm 8.1$  vs  $1.8 \pm 4.8$ ,  $P > 0.05$ ) y SAM-CTRL y SAM-SSO3 ( $0.1 \pm 0.1$  y  $1.8 \pm 4.8$ ,  $P > 0.05$ ) no fueron diferentes. Se observó una tendencia estadística ( $P = 0.09$ ) de menor porcentaje de ESC en grupo CTRL comparado con SSO3 (15.4 y 46.2 %, respectivamente). En conclusión, la SSO3 por vía transcervical no incrementa el número de NPMN endometriales y el tratamiento preventivo con SSO3 aplicado a vacas SAM no disminuyó la ESC. Los resultados sugieren un posible efecto antiinflamatorio del tratamiento solución salina ionizada.

**Palabras clave:** Ozonoterapia, Puerperio, Holstein.

Recibido: 15/07/2020

Aceptado: 30/03/2021

La endometritis subclínica (ESC) es una enfermedad puerperal con alta prevalencia en los establos lecheros<sup>(1,2)</sup>. Las vacas con ESC se caracterizan por presentar altos conteos de neutrófilos polimorfonucleares (NPMN) en muestras citológicas endometriales. Esta enfermedad repercute negativamente en el desempeño reproductivo porque reduce la tasa de concepción por servicio incrementando los días abiertos<sup>(1,2)</sup>. Además, es una enfermedad difícil de diagnosticar a nivel de campo ya que requiere el uso de instrumental especializado y el uso de un microscopio<sup>(3,4)</sup>. Aunado a esto, se ha reportado que otras enfermedades puerperales, como la retención de membranas placentarias y la metritis, son factores de riesgo para la ESC<sup>(5,6)</sup>. En cuanto a la patogenia, la presencia de bacterias en el útero estimula la liberación de citocinas proinflamatorias en el endometrio que favorecen la migración de NPMN para combatir la infección<sup>(7,8)</sup>. Estudios sugieren que la ESC se desarrolla a consecuencia de una elevada producción de citocinas proinflamatorias durante el control de la infección bacteriana en el útero<sup>(1,8)</sup>. Por lo tanto, una estrategia para reducir la prevalencia de ESC pudiera ser disminuir la carga bacteriana uterina durante el posparto temprano.

Con relación a lo anterior, la terapia con ozono ha sido utilizada experimentalmente para tratar afecciones puerperales por sus propiedades bactericidas y moduladoras de la respuesta inmune. Algunos ejemplos de las enfermedades tratadas son urovagina, lesiones

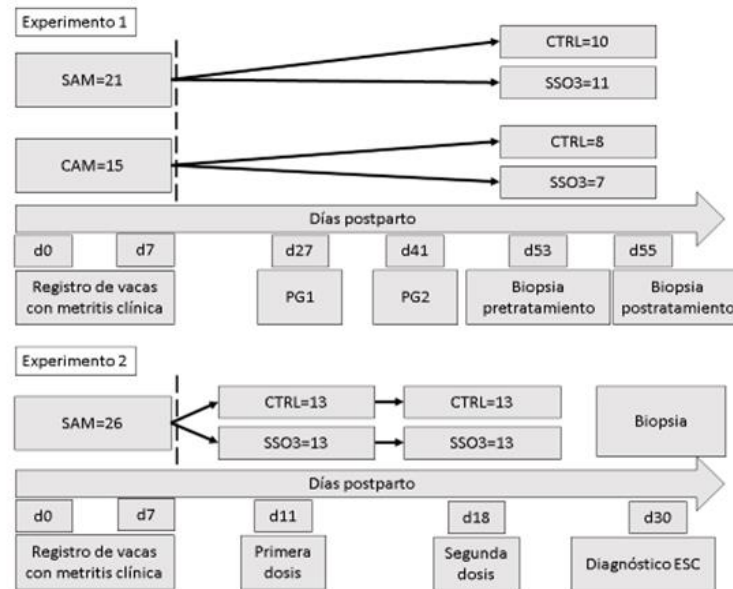
en canal de parto, mastitis, infecciones uterinas y regeneración del epitelio endometrial (revisado por Đuričić *et al*<sup>(9)</sup>). En forma específica, la terapia con ozono en forma de espuma aplicada por vía transcervical ha demostrado ser efectiva para mitigar los efectos negativos de enfermedades puerperales sobre indicadores del desempeño reproductivo<sup>(10,11)</sup>. Por ejemplo, vacas con retención de placenta, metritis o endometritis clínica tratadas con ozono tuvieron tasas de concepción similares a las de vacas sin patologías uterinas<sup>(10,11)</sup>. Estos efectos benéficos han sido atribuidos a las propiedades bactericidas del ozono<sup>(9,12)</sup>. Aunado a esto, aunque los mecanismos de acción bactericida del ozono no están completamente dilucidados<sup>(13)</sup>, reportes sugieren que la muerte de los microorganismos se induce a través de un efecto oxidante directo por los radicales libres de oxígeno liberados con la terapia<sup>(14,15)</sup>. Por otra parte, hay evidencia que sugiere que la terapia con ozono tiene la capacidad para estimular la respuesta inmune<sup>(16)</sup>. Por ejemplo, se ha reportado que el ozono aplicado en ppm en vías respiratorias induce la expresión de factores quimiotácticos (IL8 y MIP2) en el epitelio incrementando al doble el número de NPMN comparado con el grupo control<sup>(17,18)</sup>. Todo lo anterior permite suponer que, además del efecto bactericida, el tratamiento con ozono pudiera estimular la expresión de factores quimiotácticos en el endometrio incrementando el número de NPMN, sin embargo, este efecto en el útero aún no ha sido demostrado. Por lo tanto, por sus propiedades inmunomoduladoras, el objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de la solución salina ozonizada (SSO3) para incrementar la cantidad de NPMN en el endometrio y, por sus propiedades bactericidas, desafiar el efecto preventivo de esta terapia sobre la prevalencia de ESC en bovinos lecheros.

El estudio se llevó a cabo en un establo comercial en el estado de Querétaro (20° 25' N, clima semi-seco), entre los meses de agosto y octubre del 2019. Las vacas estuvieron alojadas durante todo el estudio en corrales techados y asoleaderos de tierra con acceso libre. Cada corral contó con echaderos individuales y camas con arena silica. La limpieza de los corrales se realizó una vez al día a las 1300 h. Se ofreció una ración totalmente mezclada conteniendo 55 % de forraje (alfalfa, avena y ensilado de maíz) y 45 % de concentrado (maíz molido y rolado, salvado húmedo y soya) en base seca. Las vacas fueron alimentadas una vez al día (0700 h) y con acceso a libertad a los comederos; durante el día, el alimento fue repetidamente barrido hacia el comedero para estimular el consumo.

Para producir la solución salina ozonizada, se utilizó un generador de ozono comercial de grado médico (Oxyzonic System Medic, EDE Ozone). Posteriormente, en un frasco lavador de gases se colocaron 150 ml de solución salina (NaCl 0.9%) y durante 60 seg se realizó el pase de 0.5 L/min de oxígeno de grado médico utilizando una piedra difusora de 25 mm de diámetro. La concentración de ozono en el generador se fijó a 70.09 µg/ml. En el laboratorio se determinó la concentración de ozono residual de forma indirecta con el método estándar de titulación por yodometría. Los resultados indicaron una concentración de 6.7 ± 0.3 ppm de ozono en la solución salina con este protocolo.

Para alcanzar el objetivo del estudio se diseñaron dos experimentos; el Exp 1 para evaluar la capacidad de la SSO3 de incrementar el número de NPMN en el endometrio y el Exp 2 para desafiar la capacidad de esta terapia para prevenir la ESC. En la Figura 1 se muestran los diseños experimentales correspondientes.

**Figura 1:** Diseños experimentales del estudio



SAM= vacas sin antecedentes de metritis clínica; CAM= vacas con antecedentes de metritis clínica;  
CTRL= tratamiento con solución salina; SSO3= tratamiento con solución salina ozonizada; PG= prostaglandina; ESC= endometritis subclínica.

En el Exp 1, se utilizaron 38 vacas de primera lactación de la raza Holstein, clínicamente sanas al momento de aplicar los tratamientos experimentales (vacas sin signos sistémicos de enfermedad, con útero involucionado a la palpación transrectal y sin la presencia de exudados que indicaran endometritis clínica), con un promedio de 28 L de leche en dos ordeñas (0400 y 1500 h). Durante los primeros siete días postparto se registró la presencia de vacas sin (SAM) o con metritis (CAM) diagnosticadas a partir de las características de las secreciones uterinas (líquido acuoso color café rojizo y con olor fétido<sup>(19)</sup>), estas últimas recibieron tratamiento con antibióticos locales y sistémicos de amplio espectro (ceftiofur 2 mg•kg<sup>-1</sup> sc y dos lavados uterinos con oxitetraciclina/solución salina (50:50) a intervalo de tres días con terapia de soporte). Como parte del manejo reproductivo del establo, a las vacas se les aplicó un programa de pre-sincronización que consistió en dos dosis de prostaglandina (25 mg de dinoprost trometamina) a intervalo de 14 días. Doce días después de la segunda prostaglandina (entre los 50 y 60 días postparto), se tomó una biopsia pre-tratamiento de tejido endometrial mediante la técnica de Cytobrush<sup>(3,4)</sup>. Posteriormente, las vacas en los grupos CAM y SAM fueron subdivididas para recibir por vía transcervical 50 ml de solución salina en el grupo control (CTRL) o solución salina ozonizada en el grupo tratado (SSO3). Cuarenta y ocho horas después de la

aplicación del tratamiento, se tomaron nuevamente muestras (post-tratamiento) de tejido endometrial con la misma técnica. En ambas muestras (pre y post-tratamiento), se montaron laminillas que se analizaron al microscopio a 400X, se contabilizaron 200 células, y se registró la cantidad de neutrófilos polimorfonucleares. En este experimento era necesario contar con animales sin ESC al momento de los desafíos con solución salina. Los resultados del análisis de las laminillas indicaron que dos vacas presentaron ESC ( $\geq 6\%$  NPMN<sup>(2)</sup>) en la muestra pre-tratamiento las cuales fueron descartadas del estudio para prevenirlo como factor de confusión.

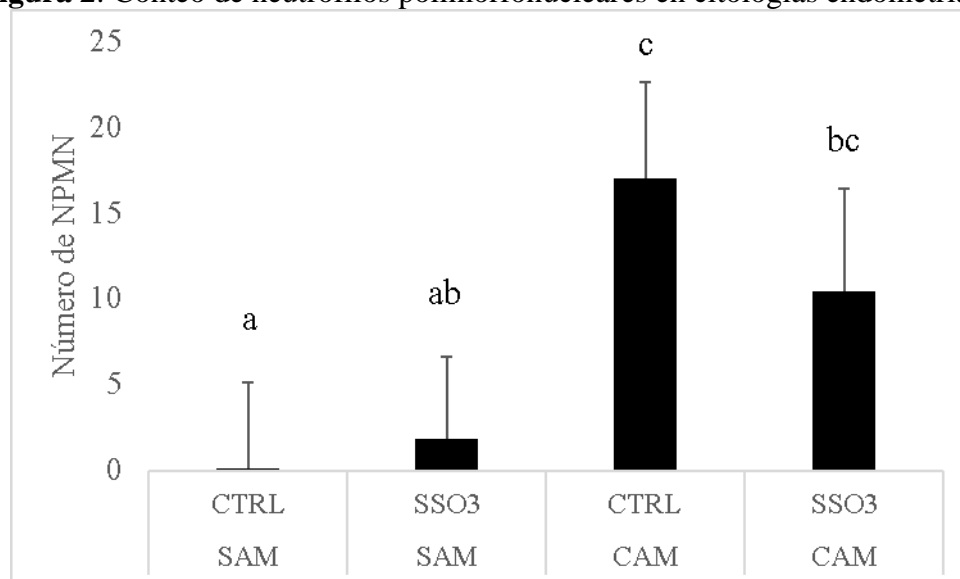
Por otra parte, en el Exp 2, se utilizaron 26 vacas de primera lactación de la raza Holstein. Las vacas se repartieron de forma aleatoria en dos grupos; control (solución salina 0.9%; CTRL) y tratamiento (solución salina ozonizada; SSO3). Utilizando pipetas de infusión, se administraron de forma intrauterina, dos dosis de 50 ml (con un intervalo de 7 días) de solución salina o de salina ozonizada. La primera dosis se administró a los  $11.3 \pm 0.4$  días postparto. Las vacas incluidas en el estudio fueron animales clínicamente sanos, sin signos de metritis y sin antecedentes de aplicación de tratamientos para enfermedades puerperales. Al día 30 postparto se realizó el diagnóstico de ESC con la técnica de Cytobrush<sup>(3,4)</sup>. Las vacas, cuyas muestras tuvieron  $\geq 6\%$  de neutrófilos polimorfonucleares (en un conteo de 200 células) en el análisis citológico, fueron diagnosticadas positivas a ESC<sup>(2)</sup>.

Referente al análisis estadístico, todos se llevaron a cabo utilizando SAS versión 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). En el Exp 1, el análisis estadístico consistió en un análisis de varianza con un diseño completamente al azar con arreglo factorial (antecedentes de enfermedades (CAM o SAM) x tratamiento con solución salina (CTRL o SSO3)) utilizando el procedimiento GLM. Se llevó a cabo el análisis de residuales con el procedimiento UNIVARIATE para verificar el cumplimiento de los supuestos del modelo. Para cumplir con los supuestos del análisis de varianza, la variable de respuesta (número de NPMN) fue transformada logarítmicamente ( $\log Y = \log(Y+1)$ ). Para facilitar la interpretación de los resultados, las medias y los errores estándar se muestran sin transformar. La comparación entre medias se llevó a cabo utilizando la opción PDIF. En el Exp 2, para determinar si existieron diferencias entre el porcentaje de vacas con ESC se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para determinar el riesgo que tuvo una vaca para desarrollar ESC se obtuvo la razón de momios a través de un análisis de regresión logística simple con el procedimiento LOGISTIC. Para ambos experimentos, se estableció un valor de  $P < 0.05$  como umbral de significancia estadística y un valor de  $P \leq 0.1$  como indicador de tendencia.

Los resultados del Exp 1 indicaron que el efecto principal antecedentes de metritis fue significativo ( $P=0.002$ ) y la interacción antecedentes de metritis (CAM o SAM) x tratamiento con solución salina (CTRL o SSO3) mostró una tendencia estadística ( $P=0.08$ ). En relación con el efecto principal antecedentes de metritis, las vacas CAM tuvieron un mayor número de NPMN endometriales que las vacas SAM ( $13.9 \pm 6.2$  vs  $1.0 \pm 0.46$ ,  $P < 0.05$ ). En la Figura 2 se muestran los resultados de la interacción sobre el

número de NPMN en citologías endometriales por grupo. El grupo CAM-CTRL presentó mayor número de NPMN que el SAM-CTRL ( $17.0 \pm 9.6$  vs  $0.1 \pm 0.1$ ,  $P < 0.05$ ) mientras que los grupos CAM-SSO3 y SAM-SSO3 no fueron diferentes ( $10.4 \pm 8.1$  vs  $1.8 \pm 4.8$ ,  $P > 0.05$ ), aunque CAM-SSO3 si tuvo mayor cantidad de NPMN que SAM-CTRL ( $10.4 \pm 8.1$  vs  $0.1 \pm 0.1$ ,  $P < 0.05$ ). Por su parte SAM-CTRL y SAM-SSO3 no fueron diferentes ( $P > 0.05$ ). La capacidad de la vaca para montar una respuesta inmune posterior al parto es un factor determinante para controlar la proliferación bacteriana que ocurre en el útero durante el puerperio de forma natural<sup>(19,20,21)</sup>. En el presente estudio se reporta evidencia de que las vacas con antecedentes de metritis tuvieron mayores conteos de NPMN endometriales comparadas con el grupo de vacas sin antecedentes de metritis. Este efecto no puede ser atribuido a que el grupo CAM tenía mayores conteos de NPMN, debido a que se utilizaron vacas sin ESC (todas con conteos bajos de NPMN en la biopsia pre-tratamiento). Por lo tanto, una posible explicación radica en una respuesta inmune endometrial diferenciada a la aplicación de los tratamientos en ambos grupos. Se ha reportado que la solución salina tiene un efecto irritante moderado y su administración en lavados uterinos ha sido propuesto como un tratamiento efectivo contra la ESC<sup>(22)</sup>. Por otra parte, en la literatura se reporta que las vacas con endometritis clínica y subclínica y vacas con antecedentes de distocia (factor de riesgo para ESC), tienen mayores cantidades de interleucinas inflamatorias en el útero<sup>(23,24)</sup>. Además, análisis transcriptómicos revelaron que vacas con antecedentes de endometritis clínica tienen mayores niveles de IL-17A a los 21 días postparto<sup>(25)</sup>, lo cual estimula el reclutamiento de células inflamatorias vía IL-8<sup>(26,27)</sup>. Con base en lo anterior, una posible explicación a nuestros resultados (mayor número de NPMN post-tratamiento en vacas CAM), es que el endometrio pudiera tener una mayor respuesta inflamatoria a los efectos irritantes de la solución salina en las vacas con historial de metritis y endometritis clínica.

**Figura 2:** Conteo de neutrófilos polimorfonucleares en citologías endometriales

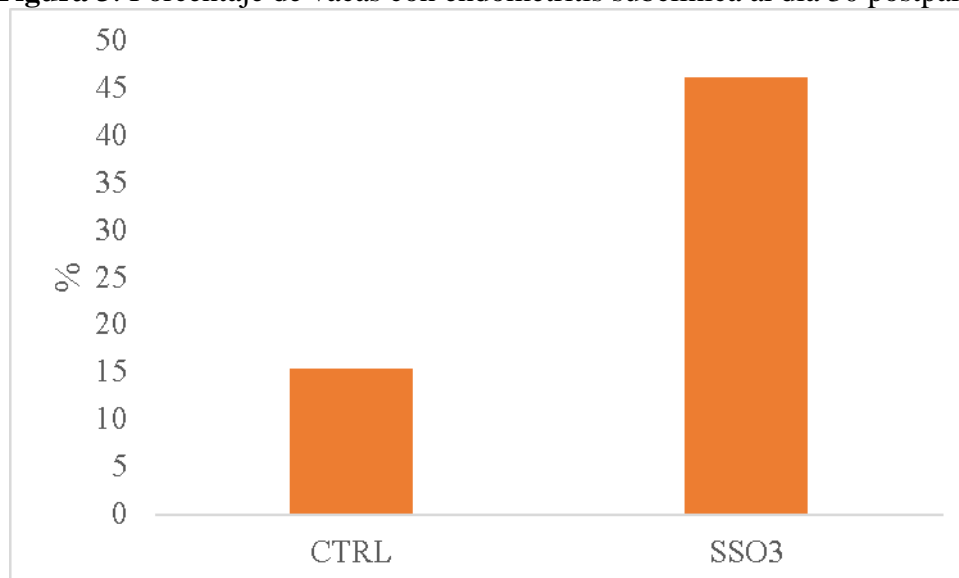


NPMN= neutrófilos polimorfonucleares; CTRL= subgrupo control con tratamiento con solución salina; SSO3= subgrupo tratamiento con solución salina ozonizada; SAM= vacas sin antecedentes de metritis clínica; CAM= vacas con antecedentes de metritis clínica.

<sup>abc</sup> Columnas con diferente letra indica diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ).

Diversos estudios reportan que la aplicación de ozono por vía intrauterina es efectiva en el tratamiento de metritis y retención placentaria, efecto que se ha asociado a su propiedad bactericida<sup>(10,11)</sup>. Además, se ha observado que el ozono estimula la expresión de factores quimiotácticos en el epitelio respiratorio<sup>(17,18)</sup>, por lo tanto, se hipotetizó que el tratamiento con ozono estimularía la migración de una mayor cantidad de NPMN al endometrio en nuestro experimento. Sin embargo, los resultados indicaron que el número de NPMN endometriales en vacas CAM-SSO3 no fue estadísticamente diferente al que presentó el grupo SAM-SSO3, es decir, el tratamiento tendió a disminuir la sobre-respuesta inflamatoria en vacas CAM. Una posible explicación a estos resultados se encuentra en estudios recientes que reportan propiedades antiinflamatorias de la terapia con ozono<sup>(16)</sup>. Se ha reportado que el tratamiento con ozono fue efectivo para disminuir la severidad de la enfermedad inflamatoria pélvica en un modelo de ratas; efecto presuntamente asociado a la disminución en la expresión de los factores inflamatorios IL-6 y TNF- $\alpha$ <sup>(28)</sup>. En otro estudio, se reportó que pacientes con osteoartritis que recibieron tratamiento local con ozono tuvieron mayor expresión de IL-10 (factor antiinflamatorio) y menores niveles de TNF- $\alpha$ <sup>(29)</sup>. Con base en esto, es posible que, con el protocolo utilizado, la terapia de ozono haya disminuido la respuesta inflamatoria local en vacas con antecedentes de metritis. Estos resultados sugieren que la terapia con ozono utilizada pudiera tener también un efecto antiinflamatorio en el endometrio. Además, con base en otros estudios<sup>(28,29)</sup>, el mecanismo pudiera ser a través de la modulación a la baja de la expresión de factores inflamatorios en vacas con antecedentes de metritis, hipótesis pendiente de ser desafiada.

Por otra parte, los resultados del segundo experimento indicaron que el porcentaje general de vacas con ESC al día 30 fue de 30.7 %. También, se observó una tendencia estadística ( $P=0.09$ ) para diferencias en el porcentaje de vacas con ESC entre grupos CTRL y SSO3 (15.4 y 46.2 %, respectivamente, Figura 3). Los resultados del análisis de regresión logística indicaron una tendencia estadística ( $P=0.1$ ); las vacas que recibieron el tratamiento con ozono (SSO3) tuvieron una razón de momios de 4.7 (0.73-30.3, IC 95%) para desarrollar ESC en comparación con las vacas que recibieron únicamente solución salina (CTRL).

**Figura 3:** Porcentaje de vacas con endometritis subclínica al día 30 postparto

CTRL= grupo control con tratamiento con solución salina; SSO3= grupo tratamiento con solución salina ozonizada. ( $P=0.09$ ).

La patogenia de la ESC no ha sido explicada completamente, sin embargo, hay reportes que indican que el origen de la enfermedad es una respuesta inmune exacerbada en respuesta a una alta cantidad de bacterias en el útero<sup>(1,8)</sup>. El razonamiento detrás del segundo experimento fue que se podría disminuir el porcentaje de vacas con ESC aplicando la terapia con ozono durante el puerperio temprano, esto para reducir la carga bacteriana presente en ese momento. Sin embargo, los resultados indicaron que las vacas que recibieron el tratamiento con SSO3 tuvieron mayor prevalencia y mayor riesgo de sufrir ESC a los 30 días postparto. Estos resultados deben tomarse con cautela, ya que a pesar de que el grupo con SSO3 tuvo tres veces más animales con ESC y la razón de momios indicó 370 % mayor probabilidad de desarrollar ESC, la significancia estadística fue a nivel de tendencia. Ahora bien, una posible explicación a estos resultados es que las dos dosis administradas a intervalo de siete días no hayan sido efectivas para reducir la carga bacteriana, pero sí para modular a la baja la respuesta inmune. En la práctica se ha observado que la aplicación de una dosis única de 50 ml de SSO3 ( $6.7 \pm 0.3$  ppm) mejora las características de las secreciones uterinas en vacas con metritis 24 h después de la aplicación del tratamiento (resultados no publicados). Sin embargo, las vacas tratadas vuelven a presentar secreciones con características de metritis en días posteriores. Esto permite suponer que el protocolo utilizado en el presente estudio pudo haber sido insuficiente para reducir la carga bacteriana en el útero. Por otra parte, se sabe que la presencia de bacterias en la luz uterina estimula la expresión de factores proinflamatorios que favorecen la migración de NPMN para combatir la infección<sup>(8)</sup>. Además, se ha reportado que un incremento en la cantidad de citocinas proinflamatorias predispone al desarrollo de ESC<sup>(1,8)</sup>. Si el tratamiento con SSO3 fue insuficiente para disminuir la carga bacteriana, pero disminuyó la respuesta inmune local, se pudo haber inducido una infección uterina más grave. Posteriormente, esta infección uterina pudo haber estimulado una respuesta inmune aún más agresiva, predisponiendo así a un mayor riesgo en las vacas para desarrollar ESC, hipótesis pendiente por desafiar. No se omite mencionar que el



presente es un estudio preliminar y los resultados del tratamiento preventivo son aplicables a vacas con un puerperio sano y sin factores de riesgo para ESC. Además, la tendencia estadística obtenida invita a tomar los resultados con cautela.

La modulación de la respuesta inmune se ha propuesto como una estrategia para reducir la prevalencia de la ESC<sup>(7)</sup>. En el primer experimento, los resultados sugieren que pudiera haber una disminución en la respuesta inmune en respuesta al tratamiento con SSO3. En el segundo experimento, los resultados indicaron que las vacas tratadas con SSO3 tienden a tener una mayor predisposición a desarrollar ESC lo cual pudo haber sido posible por un efecto inmunosupresor inducido por la terapia. Sin embargo, una limitante del presente estudio es que en el segundo experimento solo se utilizaron vacas que no estaban cursando cuadros de metritis (factor de riesgo para ESC<sup>(5,6)</sup>) y la tendencia estadística obtenida. Como se observó en el primer experimento, existe una respuesta diferenciada al tratamiento dependiendo de si los animales cursan con enfermedad uterina infecciosa. Por lo tanto, queda aún pendiente desafiar el efecto preventivo del tratamiento con ozono en vacas con factores de riesgo para ESC. A pesar de esta limitante, los resultados que aquí se presentan son fundacionales para continuar explorando los efectos de la terapia local uterina con ozono, principalmente por el aparente efecto antiinflamatorio de este elemento.

En conclusión, con el protocolo utilizado, la SSO3 por vía transcervical no incrementa el número de NPMN en el endometrio posterior a su aplicación. Además, el tratamiento con SSO3 aplicado en vacas sin antecedentes de metritis temprana incrementa el riesgo de desarrollar ESC. Una implicación de este trabajo es que la SSO3 pudiera tener un efecto antiinflamatorio local, lo cual justifica explorar la efectividad del protocolo preventivo en vacas con factores de riesgo para ESC.

### **Agradecimientos**

Al Fondo para el Fortalecimiento a la Investigación (FOFI; FNV201809) de la UAQ por el financiamiento de este proyecto. El programa académico de González-Aguado fue apoyado por CONACyT bajo la supervisión del último autor (LJMO).

### **Cumplimiento de normas éticas y conflicto de interés**

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (84FCN2018). Los autores declaran que no tienen conflictos de interés.

### **Literatura citada:**

1. Wagener K, Gabler C, Drillich M. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 2017;94:21-30.

2. Barajas Merchan JL, Hernández Cerón J, García Alfonso A, Martínez Bárcenas E, Juárez López NO, Bedolla Alva MA, *et al.* Endometritis subclínica y tasa de gestación en vacas lecheras en México. *Rev Mex Cienc Pecu* 2018;9(1):135-146.
3. Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 2008;69(6):714-723.
4. Cardoso B, Oliveira ML, Pugliesi G, Batista EDOS, Binelli M. Cytobrush: A tool for sequential evaluation of gene expression in bovine endometrium. *Reprod Domest Anim* 2017;52(6):1153-1157.
5. Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Gilbert RO. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2011;94(2):762-770.
6. Adnane M, Kaidi R, Hanzen C, England GCW. Risk factors of clinical and subclinical endometritis in cattle: a review. *Turk J Vet Anim Sci* 2017; 41(1):1-11.
7. Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, *et al.* Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrin* 2009;7(1):55.
8. Fischer C, Drillich M, Odau S, Heuwieser W, Einspanier R, Gabler C. 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. *Reprod Fertil Dev* 2010;22(5):818-829.
9. Đuričić D, Valpotić H, Samardžija M. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Anim Reprod Sci* 2015;159:1-7.
10. Djuricic D, Vince S, Ablondi M, Dobranic T, Samardzija M. Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. *Anim Reprod Sci* 2012;134(3-4):119-124.
11. Đuričić D, Lipar M, Samardžija M. Ozone treatment of metritis and endometritis in Holstein cows. *Vet Arh* 2014;84(2):103-110.
12. Megahed A, Aldridge B, Lowe J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. *Plos One* 2018;13(5):e0196555.
13. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol* 2018;56:235-241.
14. Al-Saadi H, Potapova I, Rochford ET, Moriarty TF, Messmer P. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing *Staphylococcus aureus in vitro*: a potential irrigant for infected wounds. *Int Wound J* 2016;13(5):936-942.

15. Khatri I, Moger G, Anil Kumar, N. Evaluation of effect of topical ozone therapy on salivary *Candidal* carriage in oral candidiasis. *Indian J Dent Res* 2015;26(2):158.
16. Di Mauro R, Cantarella G, Bernardini R, Di Rosa, M, Barbagallo, I, Distefano A, *et al.* The biochemical and pharmacological properties of ozone: the smell of protection in acute and chronic diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20:634.
17. Driscoll KE, Simpson L, Carter J, Hassenbein D, Leikauf GD. Ozone inhalation stimulates expression of a neutrophil chemotactic protein, macrophage inflammatory protein 2. *Toxicol Appl Pharm* 1993;119(2):306-309.
18. Chang MMJ, Wu R, Plopper CG, Hyde DM. IL-8 is one of the major chemokines produced by monkey airway epithelium after ozone-induced injury. *Am J Physiol-Lung C* 1998;275(3):L524-L532.
19. Sheldon M, Croning J, Goetze L, Danofrito G, Schubert H. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 2009;81(6):1025–1032.
20. Santos TM, Bicalho RC. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *Plos One* 2012;7(12):e53048.
21. Dervishi E, Zhang G, Hailemariam D, Goldansaz SA, Deng Q, Dunn SM, *et al.* Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows. *Res Vet Sci* 2016;104:30-39.
22. Dini P, Farhoodi M, Hostens M, Van Eetvelde M, Pascottini OB, Fazeli MH, Opsomer G. Effect of uterine lavage on neutrophil counts in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2015;158:25-30.
23. Ill-Hwa K, Hyun-Gu K, Jae-Kwan J, Tai-Young H, Young-Hun J. Inflammatory cytokine concentrations in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Theriogenology* 2014;82(3):427-432.
24. Healy LL, Cronin JG, Sheldon IM. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Sci Rep* 2014;4(1):1-9.
25. Foley C, Chapwanya A, Callanan JJ, Whiston R, Miranda-CasoLuengo R, Lu J, *et al.* Integrated analysis of the local and systemic changes preceding the development of post-partum cytological endometritis. *2015 BMC Genomics*;16(1):811.
26. Ahn SH, Edwards AK, Singh SS, Young SL, Lessey BA, Tayade C. IL-17A contributes to the pathogenesis of endometriosis by triggering proinflammatory cytokines and angiogenic growth factors. *J Immunol* 2015;195(6):2591-2600.

27. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Yoshino O, Ito M, Hasegawa A, *et al.* Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology* 2008;149(3):1260–1267.
28. Wei A, Feng H, Jia XM, Tang H, Liao YY, Li BR. Ozone therapy ameliorates inflammation and endometrial injury in rats with pelvic inflammatory disease. *Biomed Pharmacother* 2018;107:1418-1425.
29. Asadi S, Farzanegi P, Azarbayjani MA. Effect of exercise, ozone and mesenchymal stem cells therapies on expression of IL-10 and TNF- $\alpha$  in the cartilage tissue of overweight rats with knee osteoarthritis. *Soc Determ Health* 2018;4(3):162-170.