



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

**EFFECTO DE LA SOLUCIÓN SALINA OZONIZADA SOBRE LA MIGRACIÓN DE
NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES EN EL ÚTERO Y LA ENDOMETRITIS
SUBCLÍNICA**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ Jessica Bárbara González Aguado

Dirigido por:

Dr. Luis Javier Montiel Olguín

Dr. Luis Javier Montiel Olguín
Presidente

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila
Secretario

Dr. Ma de Jesús Chávez López
Vocal

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Vocal

Dr. Mario Alfredo Espinosa Martínez
Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
FECHA MES Y AÑO
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



EFFECTO DE LA SOLUCIÓN SALINA OZONIZADA
SOBRE LA MIGRACIÓN DE NEUTRÓFILOS
POLIMORFONUCLEARES EN EL ÚTERO Y LA
ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA

por

Jessica Bárbara González Aguado

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNMAC-238009

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de la solución salina ozonizada (SSO3) para incrementar la cantidad de neutrófilos polimorfonucleares (NPMN) en endometrio y evaluar su efecto preventivo sobre la endometritis subclínica (ESC). Para ambos experimentos se aplicó por vía transcervical 50 ml de solución salina, al grupo control (CTRL) y 50 ml de solución salina ozonizada (6.5 ± 0.5 ppm) al grupo tratamiento SSO3. En el experimento 1, se monitoreó durante las primeras dos semanas postparto a 38 vacas Holstein y se registró las que presentaron metritis (ENF); las vacas sin metritis se clasificaron como sanas (SAN). Posteriormente, cada grupo se subdividió en CTRL y SSO3; a los 55 días postparto se tomó una muestra citológica y se aplicó el tratamiento. Cuarenta y ocho horas después se tomaron nuevas muestras citológicas registrando el número de NPMN/200 células. En el experimento 2, se utilizaron 26 vacas Holstein sanas, se dividieron en grupo control (CTRL) y solución salina ozonizada (SSO3). Se suministraron dos aplicaciones del tratamiento con intervalo de 7 días. La primera dosis a los 11.3 ± 0.4 días postparto. Al día 30 postparto se realizó el diagnóstico de ESC ($\geq 6\%$ NPMN). Para ambos experimentos, se estableció un valor de $P < 0.05$ como umbral de significancia estadística y $P < 0.1$ como indicador de tendencia. Los resultados del primer experimento indicaron que el grupo ENF presentaron mayor número de NPMN (13.9 ± 6.2) que las vacas SAN (1.0 ± 0.46). El grupo ENF-CTRL tuvieron mayor número de NPMN (17.0 ± 9.6) comparado con SAN-CTRL (0.1 ± 0.1). Dentro del grupo SAN-SSO3 (1.8 ± 4.8) y SAN-ENF (10.4 ± 8.1), así como el grupo SAN-CTRL (0.1 ± 0.1) y SAN-ENF (1.8 ± 5), no hubo diferencias estadísticas entre grupos. En el segundo experimento se observó una mayor proporción ($P = 0.09$) de vacas con ESC en SSO3 comparado con CTRL (46.2 y 15.4%, respectivamente). En conclusión, la aplicación transcervical de SSO3, no incrementa el conteo de NPMN en endometrio y aumenta el número de vacas con ESC. Los resultados sugieren que el tratamiento SSO3, pudiera tener un efecto antiinflamatorio. **Palabras clave:** puerperio, enfermedad uterina, prevención.

ABSTRACT

This research aimed to determine the capacity of the ozonated saline solution (SSO3) to increase the number of polymorphonuclear neutrophils (NPMN) in endometrium and to evaluate its preventive effect on the subclinical endometritis (ESC). For both experiments, it was administered 50 mL of saline solution to the control group (CTRL) and 50 mL of ozonated saline solution (6.5 ± 0.5 ppm) to the treatment group (SSO3). In the first experiment, 38 Holstein cows were monitored during the first two weeks post-calving, it was recorded the ones who had metritis (ENF); cows without metritis were classified as healthy (SAN). Subsequently, each group was subdivided into CTRL and SSO3; 55 days post-calving a cytological sample was obtained and the treatment was applied. Additional cytological samples were taken after 48 hours and the number of NPMN per 200 cells was recorded. Concerning the second experiment, 26 healthy Holstein cows were divided into the control group (CTRL) and the ozonated saline solution group (SSO3). It was applied two doses of treatment with 7 days interval. The first dose was infused 11.3 ± 0.4 days post-calving. ESC diagnosis (≥ 6 % NPMN) was determined at 30 days post-calving. For both experiments, $p < 0.05$ was the statistical significance threshold and $P > 0.1$ was considered as a statistical trend. Results from the first experiment showed that the ENF group had more NPMN (13.9 ± 6.2) than the SAN cows (1.0 ± 0.46). The ENF-CTRL group presented a higher number of NPMN than the SAN-CTRL (17.0 ± 9.6 vs. 0.1 ± 0.1 , $P < 0.05$) while the ENF-SSO3 and SAN-SSO3 groups (10.4 ± 8.1 vs. 1.8 ± 4.8 , $P > 0.05$) and SAN-CTRL and SAN-SSO3 (0.1 ± 0.1 and 1.8 ± 4.8 , $P > 0.05$) were not different. In the second experiment, it was observed a higher proportion ($P = 0.09$) of ESC cows in the SSO3 group compared to the CTRL group (46.2 and 15.4 %, respectively). In conclusion, transcervical administration of SSO3 does not increase the NPMN count in the endometrium and increases the number of cows with ESC. These results suggest SSO3 treatment could have an anti-inflammatory effect. **Keywords:** puerperium, uterine disease, prevention.

DEDICATORIA

A mi familia que es mi razón de ser

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial, Dr. Montiel, Dr. Vera, M en C. López, Dr. Cantó y Dr. Espinosa.

A mi equipo de trabajo, Anett Estrella, Enrique Ramírez, Dan Ponce, Benjamín Ramsés, Gustavo Mejía, Juan González.

A la MVZ Eliza Ochoa y a la M en CQB Claudia Gutiérrez.

A la MSPAS, pero de especial manera, la Dra. Araceli Barreiro y la Dra. Gabriela Aguilar.

A CONACYT por el apoyo económico.

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER; 201901294), así como al Fondo para el Fortalecimiento a la Investigación (FOFI; FNV201809) de la Universidad Autónoma de Querétaro por el financiamiento de este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Importancia del desempeño reproductivo en establos lecheros	3

2.2	Puerperio.....	3
2.2.1	Expulsión de la placenta.....	4
2.2.2	Involución uterina.....	5
2.2.3	Loquios.....	6
2.2.4	Restablecimiento de la actividad ciclicidad estral postparto.....	6
2.2.5	Control de la contaminación bacteriana.....	7
2.3	Enfermedades puerperales.....	8
2.3.1	Patogenia de enfermedades puerperales.....	8
2.3.2	Metritis.....	10
2.3.3	Endometritis clínica.....	11
2.3.4	Endometritis subclínica.....	12
2.4	Mecanismos de defensa del útero.....	15
2.4.1	Consideraciones anatómicas.....	15
2.4.2	Inmunidad uterina.....	16
2.5	Tratamiento para las enfermedades puerperales.....	16
2.5.1	Tratamientos hormonales.....	17
2.5.2	Tratamientos antibióticos.....	17
2.6	Resistencia bacteriana a antibióticos.....	19
2.7	Ozono.....	21
2.7.2	Ozonoterapia en buiatría.....	24
III.	JUSTIFICACIÓN.....	26
IV.	HIPÓTESIS.....	27
V.	OBJETIVO.....	28
5.1	Objetivo general.....	28

5.2	Objetivos específicos	28
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1	Ubicación y condiciones climáticas	29
6.1.1	Manejo general del establo.....	29
6.2	Producción de solución salina ozonizada	29
6.3	Experimento 1	30
6.3.1	Diseño experimental.....	30
6.3.2	Análisis estadístico	31
6.4	Experimento 2.	32
6.4.1	Diseño experimental.....	32
6.4.2	Análisis estadístico	33
VII.	RESULTADOS	34
7.1	Resultados experimento 1	34
7.2	Resultados experimento 2	35
VIII.	DISCUSIÓN	37
IX.	CONCLUSIÓN	41
X.	BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO

1	Estadísticas descriptivas por grupo para el experimento 1.....	34
2	Estadísticas descriptivas por grupo para el experimento 2.....	35
3	Porcentaje de vacas con y sin endometritis subclínica por grupo.....	36
4	Conteo de neutrófilos polimorfonucleares en vacas con y sin endometritis subclínica, por grupo y total.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG

1	Disminución del diametro de los cuernos uterinos postparto	5
2	Patogenia de las enfermedades puerperales.....	10
3	Clasificación del moco cervical para la endometritis clínica.....	12
4	Enfermedades puerperales en ganado bovino.....	13
5	Proyección 2050 de muertes por resistencia bacteriana.....	20
6	Diseño experimental 1.....	31
7	Diseño experimental 2.....	33
8	Promedio de neutrófilos polimorfonucleares por grupo en citologías endometriales 48 horas después de aplicado el tratamiento.....	35

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reproductivas representan pérdidas económicas considerables en los establos lecheros. Estas pérdidas se derivan de la aplicación de tratamientos, descarte de la leche por residuos antibióticos, desechos involuntarios y por el incremento de días en los cuales la vaca no puede concebir (LeBlanc, 2008; Fouz et al., 2014). Durante el puerperio, casi el 100% de las vacas cursa por alguna enfermedad uterina: metritis, endometritis o endometritis subclínica (Sheldon et al., 2009). La principal terapia para combatir estas enfermedades es la antibiótica, sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro contribuye a la generación de resistencia bacteriana; la cual avanza mucho más rápido que el desarrollo de nuevos medicamentos (O'Neill et al., 2016). Para mitigar este problema, existen terapias alternativas al uso de antibióticos que están dando buenos resultados, por ejemplo, la terapia con ozono (Travagli et al., 2009). El ozono es un gas inestable, más en altas concentraciones, la molécula de ozono es altamente reactiva, presenta actividad bactericida, fungicida, antivírica, antilevaduras y antiprotozoos. En la terapia médica son raros los efectos negativos en la salud humana y de animales (Bocci et al., 2006).

Por otra parte, la endometritis subclínica (ESC) es un padecimiento que tiene una prevalencia de entre el 20 y 40% en establos lecheros (Barajas Merchan et al., 2018). Las vacas que presentan enfermedades uterinas en el puerperio (metritis, endometritis, retención placentaria) tienen 60% más probabilidad de presentar ESC. Esta enfermedad disminuye en un 11% la tasa de concepción al primer servicio y un 14% la tasa de concepción general (Barajas Merchan et al., 2018). Además, impacta negativamente el desempeño reproductivo en los establos y es difícil de diagnosticar a nivel de campo ya que no presenta signos clínicos (Bogado y Opsoner, 2017). Debido a la alta prevalencia y al impacto negativo que tiene esta

enfermedad sobre el desempeño reproductivo, es necesario desarrollar estrategias para disminuir la cantidad de vacas que la presentan.

Aunado a lo anterior, se ha observado que al aplicar ozono por vía inhalada induce actividad inflamatoria y existe liberación de factores quimiotácticos en pulmones de ratones, monos y conejillos de indias (Driscoll et al., 1993; Miller et al., 2017; Wicher et al., 2017). Además, recientemente se ha demostrado que la terapia con ozono tiene la capacidad de regular la respuesta inmune en diferentes modelos experimentales (Di Mauro et al., 2019) Por lo tanto, es posible que la terapia con ozono en el endometrio pudiera ejercer un efecto proinflamatorio, incrementando las células de defensa (neutrófilos polimorfonucleares), sin embargo, esto no ha sido demostrado aún.

La terapia con ozono se ha utilizado para prevenir o tratar enfermedades en ganado Holstein y Simmental. Para tratamiento de urovagina, a través de la aplicación de ozono en aerosol (Zobel et al., 2012). En el tratamiento preventivo de enfermedades como metritis y endometritis clínica, durante el puerperio, mejorando tasa de servicio por concepción (Djuricic, et al., 2012), y en la disminución en el periodo de días abiertos (Zobel et al., 2014). A pesar de estos resultados, se desconoce con exactitud los mecanismos de acción a nivel de endometrio, así como su posible efecto modulador en la respuesta inmune. Finalmente, se desconoce si existe un efecto preventivo para endometritis subclínica.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la aplicación de ozono sobre la migración de neutrófilos polimorfonucleares hacia el endometrio y determinar su efecto preventivo en la endometritis subclínica.

II. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del desempeño reproductivo en establos lecheros

La vida productiva de una vaca lechera inicia en su primer parto y termina con la eliminación de ésta del establo. Una baja producción de leche, una baja fertilidad o enfermedades pueden disminuir la vida productiva de la vaca (Orrego et al., 2013). El desempeño reproductivo es un elemento clave en la producción lechera porque está altamente asociado con la rentabilidad (LeBlanc, 2008; Fouz et al., 2014). Sin embargo, muchos son los factores que afectan este desempeño, por ejemplo, la nutrición, el número de lactación, la época de parto, enfermedades reproductivas, etc. (Lee et al., 2007; Mahnani et al., 2015). Aunado a esto, las enfermedades reproductivas son una de las principales causas de desecho involuntario en el establo lechero (Orrego et al., 2013; Fouz et al., 2014; Armengol y Fraile, 2018). Por lo tanto, es prioritario implementar estrategias y desarrollar herramientas que disminuyan las enfermedades que afectan la salud uterina.

2.2 Puerperio

La palabra puerperio proviene del latín *Puer*, que significa niño y *Párere* que significa parir. El puerperio comprende desde el parto, hasta la involución completa del órgano reproductor al estado anterior a la gestación. Durante el puerperio, el útero además de regresar a su estado anatómico anterior, también se prepara de manera fisiológica para recibir, anidar, nutrir y desarrollar la próxima gestación (Jenkin et al., 2004). Esta etapa influye de manera definitiva en el estado reproductivo de la hembra (Sheldon et al., 2006) Además, durante este periodo ocurren importantes modificaciones anatómicas, histológicas, citológicas, bacteriológicas y metabólicas en el útero (Sheldon et al., 2011^a).

Se puede determinar la conclusión del puerperio una vez sucedidos cuatro eventos: el útero debe haber involucionado, el endometrio debe haber recuperado

su integridad y haberse regenerado, se controló la contaminación bacteriana y se reinició la ciclicidad ovárica estral (Sheldon et al., 2008). Durante el puerperio, aproximadamente el 40% de las vacas presentan infecciones uterinas asociadas en mayor medida a retenciones placentarias o distocias (Bajcsy et al., 2005; Purohit et al., 2011). Posterior a estos acontecimientos, el animal tiene dificultades para gestar nuevamente, por lo que lleva un periodo de recuperación prolongado que pone en riesgo la permanencia del animal en el establo (Armengol y Fraile, 2018).

2.2.1 Expulsión de la placenta

Los procesos que conllevan al parto y la expulsión de la placenta son paralelos en algunas especies. Sin embargo, en los rumiantes, la expulsión de la placenta ocurre una vez expulsado el producto. Antes de comenzar la expulsión de membranas placentarias, ya han ocurrido cambios previos que permiten el desprendimiento de los cotiledones. El epitelio de las criptas maternas se aplana y se acumulan células gigantes binucleadas, que van a fagocitar y absorber los líquidos. Aunado a esto, la serotonina en la sangre fetal dará la señal principal para la degradación del colágeno y también generará la vasoconstricción en la circulación del placentoma. La disminución de la unión formada por el colágeno permite que la placenta se desprenda sin generar traumatismo (LeBlanc, 2008). Después de la pérdida del alantocorion, se genera necrosis en las carúnculas, seguido por eliminación de loquios continua por 12 a 15 días. En esta etapa se puede palpar todo el tracto reproductivo, aunque el cuerno que estaba grávido aún se encuentra con mayor diámetro (Djuricic et al., 2012). Si bien, la recuperación del tamaño del tracto reproductor se alcanza a los 25 o 30 días, el endometrio tarda más en su regeneración, estando totalmente listo entre seis y ocho semanas después del parto (Sheldon et al., 2011^a).

2.2.2 Involución uterina

La involución uterina debe llevarse a cabo entre los 25 y 30 días posteriores al parto donde el peso del útero pasa de 10 a 1 kg (Palmer, 2007). Durante el parto, la liberación de oxitocina es promovida por el reflejo de expulsión fetal, esta hormona propicia en mayor medida las contracciones del útero. Su acción contribuye a eliminar las membranas placentarias y a disminuir el volumen uterino (Csaba et al., 2004), así como a la eliminación de loquios y bacterias (Sheldon et al., 2008). La involución uterina y la regeneración del endometrio tienen periodos de recuperación distintos. A pesar de que el útero ya ha regresado a su tamaño normal, el endometrio tiene un proceso más lento en la recuperación. El desprendimiento rápido de las carúnculas, contribuye a una involución más pronta. Al centro de las carúnculas se inicia la regeneración del endometrio, éste sufre un proceso de degeneración y descamación generándose de manera centrípeta. El epitelio se ve recuperado entre los 30 y 45 días mientras que a las capas más profundas les toma alrededor de siete semanas para la recuperación completa (Góngora et al., 2007; Sheldon et al., 2008).

La figura 1 ilustra la involución de los cuernos uterinos, grávido y no-grávido, durante las primeras nueve semanas posteriores al parto.

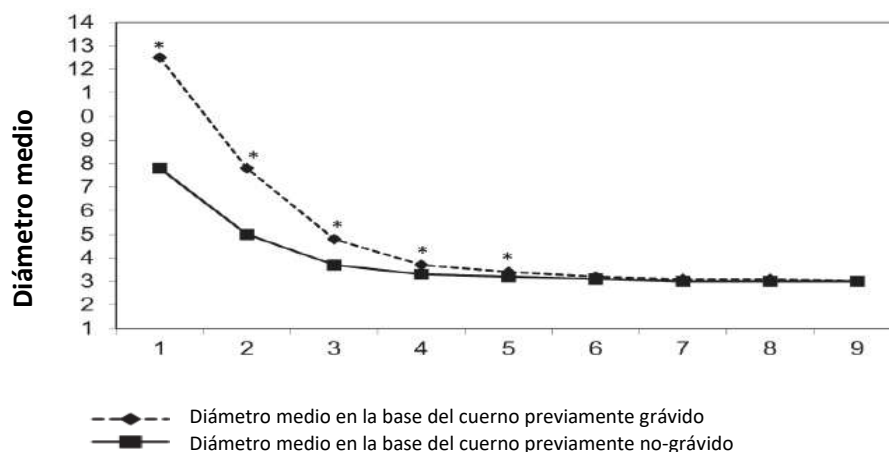


Figura 1. Disminución del diámetro de los cuernos uterinos postparto. Diferencia en la involución de los cuernos uterinos, grávido y no-grávido, durante las primeras 9 semanas postparto. Editado de Stephen et al., 2019.

2.2.3 Loquios

Los loquios del griego *Lochios*, que significa relacionado con el nacimiento, son los residuos de líquido acumulado en el útero después del parto. Se compone de glóbulos rojos, descamación epitelial, secreciones de la mucosa uterina, componentes de los elementos de la reparación del útero, así como de bacterias. El útero contiene de uno a dos litros de loquios inmediatamente después del parto (LeBlanc, 2008; Sheldon et al., 2008). Durante los primeros días, el líquido presenta características sanguinolentas, para dar paso posteriormente a un líquido más denso con cantidad variable de sangre. Entre los 7 y 14 días se torna de color café, para posteriormente ser cristalino y no presentar olor fétido. Cuando el curso de los eventos sigue lo mencionado, se interpreta que la involución uterina transcurrió de manera normal (Sheldon et al., 2011^b).

2.2.4 Restablecimiento de la actividad ciclicidad estral postparto

El reinicio de la actividad cíclica estral en las vacas no siempre se da de manera automática. Las deficiencias en la energía de la dieta o la presencia de situaciones de estrés y enfermedades propicia que las vacas presentan alteraciones fisiológicas como celos anormales, quistes foliculares, fases lúteas extendidas o anestros anovulatorios (LeBlanc, 2008). De manera normal, posterior al parto los niveles de progesterona disminuyen a su nivel basal. Gracias al incremento en la frecuencia de los pulsos de GnRH/LH el folículo dominante continúa con su desarrollo mientras que los demás folículos sufren atresia. El folículo dominante desarrolla receptores para LH lo que le permite continuar con su desarrollo y ovular al generarse el pico preovulatorio de GnRH/LH. En condiciones normales, es decir sin complicaciones patológicas, entre los 15 y 21 días postparto se habrá dado la ovulación (Sheldon et al., 2011^b).

Las enfermedades puerperales pueden impedir el retorno a la ciclicidad ovárica estral, así como propiciar infertilidad de la vaca. En general, las

enfermedades puerperales siempre van a estar asociadas con un bajo desempeño reproductivo (LeBlanc, 2008). En vacas con infecciones uterinas, el folículo dominante tiene un crecimiento más lento y existe una concentración inferior de estradiol en plasma. La fase lútea, en algunas ocasiones se ve extendida, probablemente debido a que la infección cambia la secreción del epitelio endometrial de prostaglandina F a prostaglandina E, de esta manera se retarda el reinicio de la ciclicidad ovárica (Sheldon et al., 2009).

2.2.5 Control de la contaminación bacteriana

Antes del parto, el lumen uterino no es estéril, ya que existe microbiota presente en el útero pero que no está asociada a un proceso inflamatorio (Karstrup et al., 2017). Durante el parto, se pierde la barrera física que impide la entrada masiva de agentes causantes de enfermedad, en su mayoría bacterias. De manera normal, en las primeras dos semanas posteriores la parto, el útero es invadido por agentes contaminantes. Muchas vacas pueden controlar y eliminar la infección en cuatro o cinco semanas, pero algunas de ellas no (Sheldon et al., 2006). El sistema inmune innato es el responsable de mitigar la invasión bacteriana. Este control es principalmente mediado por neutrófilos polimorfonucleares (NPMN), que son reclutados desde la sangre periférica (LeBlanc, 2008). Sin embargo, se sabe que la capacidad fagocítica de estas células se reduce después del parto y puede predisponer a enfermedades en el tracto uterino (Boer et al., 2015).

Aproximadamente entre el 80 y el 100% de las vacas sufren contaminación bacteriana durante las dos primeras semanas posteriores al parto (Sheldon et al., 2009). *Escherichia coli* y *Truperella pyogenes* son las bacterias con mayor aislamiento en la luz uterina, seguido de bacterias anaerobias como *Prevotella*, *Fusobacterium necrophorum* y *Fusobacterium nucleatum* (LeBlanc et al., 2002; Karstrup et al., 2017). Aunado a esto, existen contracciones uterinas posteriores al parto que son estimuladas mediante la oxitocina. Estas contracciones ayudan a la

eliminación de bacterias, forzando la eliminación de loquios y la disminución del tamaño del útero (Paisley et al., 1986).

2.3 Enfermedades puerperales

Los cambios en el manejo alrededor del parto como las modificaciones en dieta, menor consumo de materia seca, el inicio de la lactación, la alta demanda de nutrientes y el proceso de involución uterina pueden ser factores que promueven que la vaca sea propensa a sufrir enfermedades (Sordillo et al., 2013). Existen factores que han sido identificados como factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades uterinas. Algunos ejemplos son los partos gemelares, distocias, retención placentaria y nacidos machos, aunado a la persistencia de bacterias patógenas en el útero (Potter et al., 2010). Las principales enfermedades uterinas puerperales son: la metritis, la endometritis clínica y la endometritis subclínica. Estas enfermedades van a afectar el desempeño reproductivo del animal, incrementando el riesgo de su eliminación del hato (LeBlanc, 2008).

2.3.1 Patogenia de enfermedades puerperales

Posterior al parto, las infecciones bacterianas más comunes son las ocasionadas por *E. coli* y *T. pyogenes*. Seguidas por bacterias anaerobias como algunas especies de *Prevotella*, *Fusobacterium necrophorum*, y *Fusobacterium nucleatum*. La infección con *E. coli* durante los primeros días posparto está asociada a disfunción en el ovario, así como en el eje hipotálamo-hipófisis. Además, la infección con esta bacteria colabora para que otros tipos de bacterias o virus infecten el útero (Sheldon et al., 2002; Credille et al., 2014). La vía por la que la bacteria *E. coli* es reconocida por el epitelio uterino es través de los receptores celulares asociados a patógenos (Toll-Like Receptors; TLRs). Estos receptores identifican DNA bacteriano, lípidos y lipopolisacáridos propiciando la liberación de péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas. A su vez estos factores atraen a

NPMN y macrófagos para eliminar las bacterias (Sheldon et al., 2009; Boer et al., 2015).

T. Pyogenes provoca lesiones graves en el endometrio. Esta bacteria forma un poro en la célula, a través de una citocina dependiente de colesterol llamada *Pylosin*. La enzima *Pylosin* se agrega en los dominios ricos en colesterol de la membrana celular llevando a la célula a una muerte osmótica. *T. pyogenes*, *F. necrophorum* y algunas especies de *Prevotella* actúan de forma sinérgica y agravan la enfermedad uterina. *F. necrophorum* produce leucotoxinas, *P. meliniogenicus* produce una sustancia que inhibe la fagocitosis y *T. pyogenes* produce un factor de crecimiento para *F. necrophorum*. En conjunto causan un severo daño y complican la infección (Sheldon et al., 2002; Boer et al., 2015).

El Herpesvirus Bovino tipo 4, es el único virus asociado con enfermedad uterina después del parto. Puede establecer infecciones latentes particularmente en macrófagos. Es altamente trópico hacia las células endometriales y su replicación se ve estimulada por la liberación de prostaglandina E y lipopolisacáridos (liberados por *E. coli*), formando sinergia con las enfermedades bacterianas (Sheldon et al., 2009). Por otra parte, la liberación de citocinas y quimiocinas atraen NPMN y macrófagos, sin embargo, su función se ve comprometida en bovinos en el momento del parto (Sheldon et al., 2009). La figura 2 muestra la sinergia establecida entre bacterias y virus en el periodo posparto en ganado.

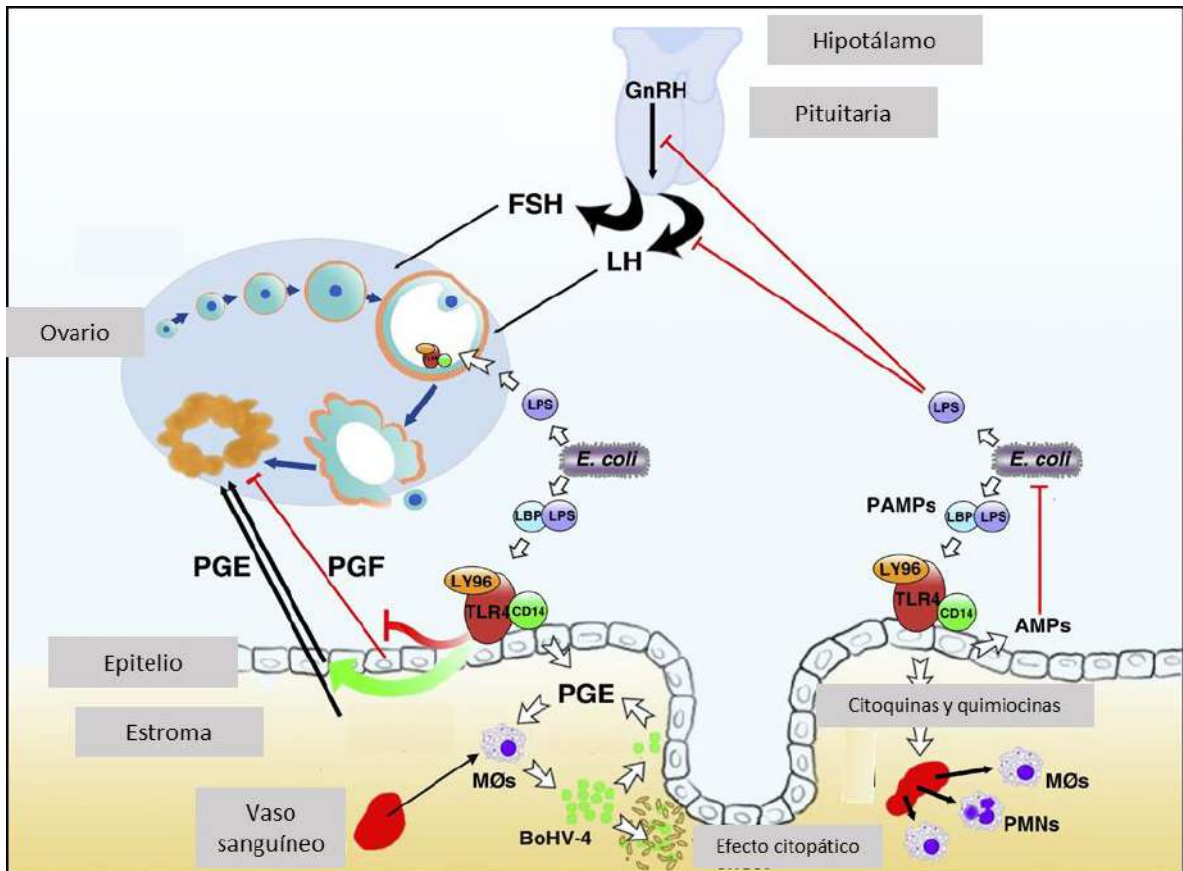


Figura 2. Patogenia de las enfermedades puerperales. El sistema inmune innato es alertado por los receptores TLRs de las células endometriales. El DNA bacteriano y lipopolisacáridos (LPS), son las moléculas reconocidas por el sistema inmune. Los LPS (lipopolisacáridos) de *E. coli* se unen a la proteína de unión para LPS (LBP). Las células del endometrio liberan citocinas y quimiocinas para activar la respuesta inmune y aumentar la expresión de AMP. Secretan principalmente PGE en lugar de PGF. La infección causa inflamación y daño en el endometrio, lo que disminuye las probabilidades de gestación. Editado de Sheldon, *et al.*, 2002.

2.3.2 Metritis

Metritis, es la infección uterina que se desarrolla dentro de los primeros 21 días posparto (la mayor cantidad de casos se presenta alrededor del día 10). La metritis se caracteriza porque el útero se encuentra agrandado, presenta una secreción que puede ser líquida o viscosa y en tonalidades que van de café a marrón. Además, clínicamente se presenta una descarga purulenta y con un olor fétido (Sheldon *et al.*, 2002; Sheldon *et al.*, 2006; Overton *et al.*, 2008).

La metritis se clasifica en tres grados de acuerdo con su severidad. Se habla de una metritis de grado 1 cuando el útero se encuentra anormalmente agrandado y presenta descarga purulenta, pero no presenta signos sistémicos de enfermedad. En la metritis grado 2 o metritis clínica, se observan animales con las mismas características de la metritis grado 1, aunados a signos sistémicos, como fiebre, baja en la producción de leche y apatía. Los animales con signos de toxemia, como inapetencia o extremidades frías, se clasifican como mastitis de grado 3 y su pronóstico es reservado (Williams et al., 2005; Sheldon et al., 2013). La metritis puede ser diagnosticada de manera sencilla a través de la observación de las descargas uterinas. También pueden utilizarse pruebas como cultivos bacterianos, citologías o biopsias (LeBlanc, 2008).

2.3.3 Endometritis clínica

La endometritis clínica se define como la presencia de secreción purulenta en el útero posterior a los 21 días al parto (la mayor cantidad de casos alrededor del día 25). Se caracteriza por la presencia de agentes patógenos en la luz uterina (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2002). La endometritis se asocia con un mal desempeño reproductivo, una menor tasa de concepción, un mayor intervalo entre partos y una menor producción de leche (McDougall et al., 2007).

El diagnóstico de la endometritis clínica se realiza a través del análisis visual de las descargas vaginales. Estas descargas se obtienen de manera manual con estimulación transrectal. Se debe limpiar la vulva con una toalla de papel seca, con un guante de palpación y un poco de lubricante para introducir la mano en la vagina. Se procura hacer un masaje cuidadoso en el tercio caudal de las paredes de la vagina para de esta manera obtener el moco vaginal (Sheldon et al., 2006). La gravedad de la enfermedad puede ser clasificada de acuerdo con sus características físicas (Sheldon et al., 2006). La figura 3 muestra la calificación para el moco cervical.

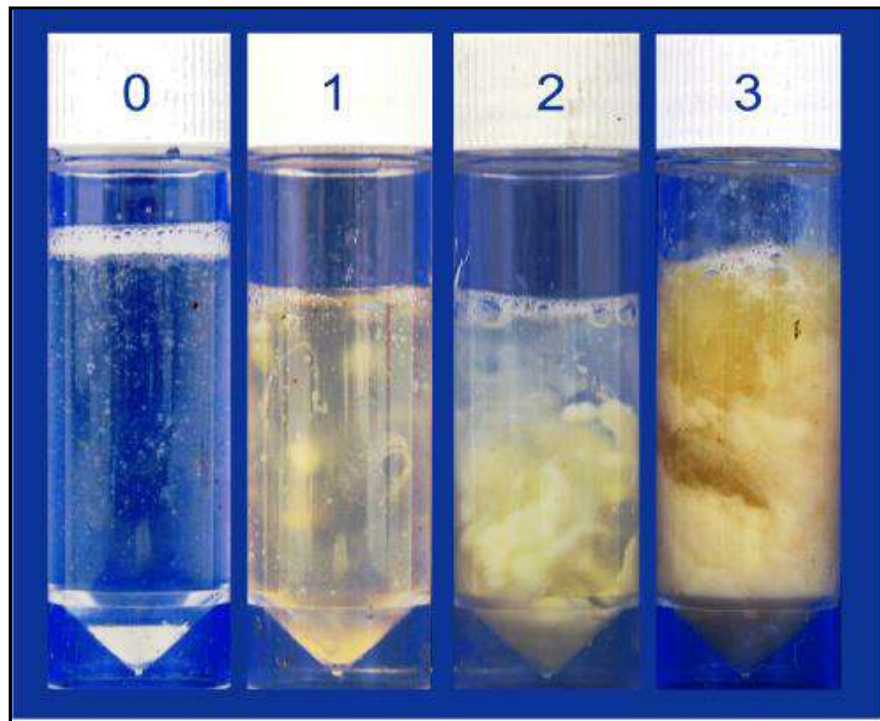


Figura 3. Clasificación del moco cervical para la endometritis clínica. 0= moco transparente o translúcido, 1, moco con manchas blanquecinas, 2, moco con el 50% de contenido purulento, 3, exudado que contiene el 50% de material purulento blanco, amarillo y ocasionalmente sanguinolento. Sheldon, et al., 2002.

2.3.4 Endometritis subclínica

La endometritis subclínica más recientemente denominada endometritis citológica, designada de esta manera por el método de diagnóstico (citobrush) (Dubuc et al., 2010), es un padecimiento que tiene una prevalencia entre el 20 y 40% en estrablos lecheros (Barajas Merchan et al., 2018). Las vacas que presentan enfermedades uterinas en el puerperio (metritis, endometritis, retención placentaria) tienen 60% más de probabilidad de presentar ESC. Esta enfermedad disminuye en un 11% la tasa de concepción al primer servicio y un 14% la tasa de concepción general al día 120 (Barajas Merchan et al., 2018). La ESC impacta el desempeño reproductivo de la vaca y es difícil de diagnosticar a nivel de campo ya que no presenta signos clínicos (Bogado y Opsoner, 2017). La figura 4 representa el

porcentaje de vacas que presentan enfermedad puerperal hasta el día 70 posparto (Sheldon, et al., 2002).

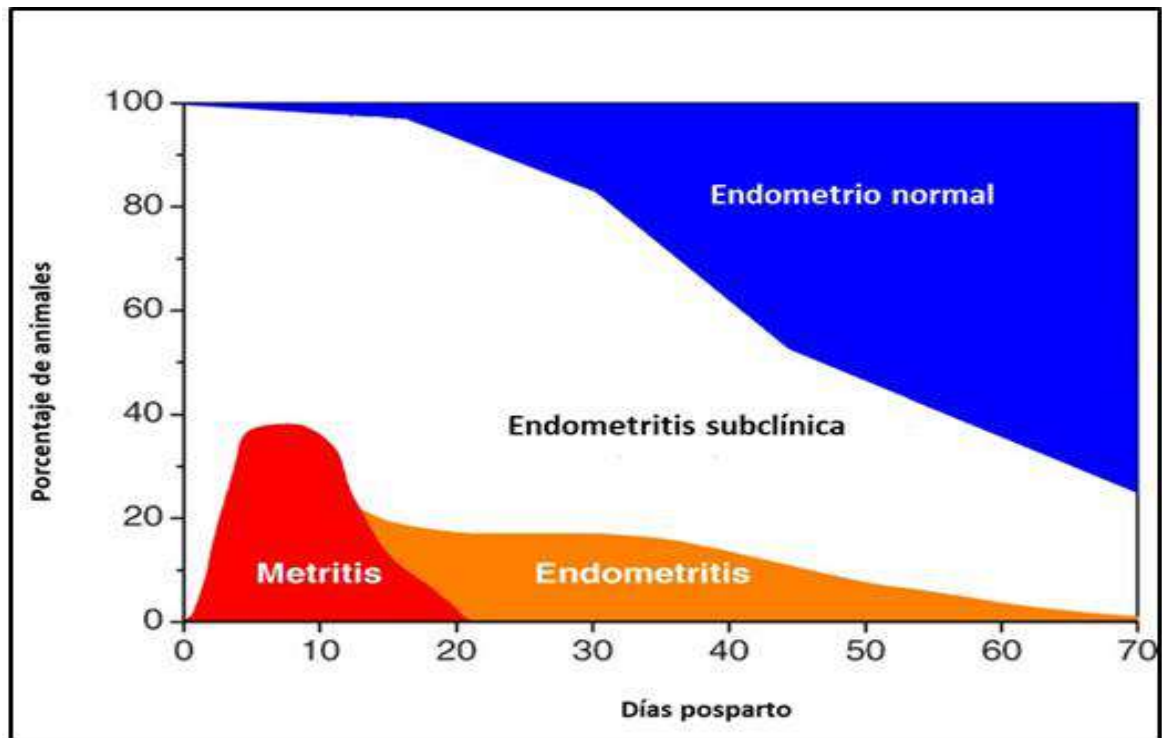


Figura 4 Enfermedades puerperales en ganado bovino. El porcentaje de vacas que presentan: rojo, metritis; amarillo, endometritis; blanco, endometritis subclínica; azul, endometrio normal. Editado de Sheldon et al., 2009.

La ESC se caracteriza por la inflamación del endometrio sin presencia de agentes infecciosos ni descargas uterinas. Únicamente se observa la presencia de NPMN en el útero en proporciones superiores a 8%, 6%, 4% y 5% a los 21-33, 34 a 47, 48 a 62 y 21 a 62 días postparto, respectivamente (De La Sota et al., 2014). Se ha demostrado que la proporción de NPMN no varía durante el ciclo estral en vacas que no presentan ESC (Sheldon et al., 2006). Debido a que esta enfermedad no es de índole infeccioso, el tratamiento antibiótico no es funcional (Wagener et al., 2017). En la actualidad no existe un tratamiento que haya demostrado ser efectivo para prevenir o disminuir la ESC (Barajas Merchan et al., 2018).

La ESC depende de la severidad y de la duración de la respuesta inmune (Peter et al., 2015). Durante las dos o tres semanas previas al parto, las células inmunes sufren una disminución en sus funciones, llegando a su punto más bajo, uno o dos días después del parto. La recuperación de manera gradual, entre tres y cuatro semanas después del parto, también está asociada con la capacidad de la vaca de montar una respuesta inmune temprana (Kimura et al., 2014). Se ha demostrado que durante las primeras tres semanas posteriores al parto la proporción de NPMN varía, teniendo una disminución en el posparto temprano, seguido por un incremento y finalmente una disminución. Las vacas que presentan una respuesta inmune adecuada de manera temprana (durante los primeros 21 días en leche), corren menos riesgo de cursar por ESC. Las vacas en las que la respuesta inmune es tardía, (alrededor de los 45 días en leche), corren mayor riesgo de cursar por ESC (Peter et al., 2015).

Los NPMN son la principal célula fagocítica en el útero. Son reclutados desde la sangre periférica y su función es crucial para eliminar la infección. Los NPMN son atraídos a través de factores quimiotácticos liberados por el epitelio uterino (Ghasemi et al., 2012). El epitelio uterino es estimulado de manera directa o indirecta por agentes patógenos (Subandrio et al., 1997).

Una vez reconocidos los agentes patógenos, son liberadas moléculas proinflamatorias como el FNT α , interleucinas (IL1A, IL1B, IL6, IL8) y citocinas (CXCL1 y CXCL2) (Herath et al., 2006; Ghasemi et al., 2012) estas moléculas parecen seguir un patrón de expresión que depende del periodo puerperal tanto en animales sanos como enfermos (Prunner et al., 2014). A la par de la liberación de moléculas pro inflamatorias, se liberan también moléculas antiinflamatorias como la IL10 con la finalidad de regular la agresividad de la respuesta inmune.

Se ha encontrado una mayor proporción de IL10 con IL1A e IL1B durante la primera semana postparto en vacas fértiles, comparada con vacas que presentan infertilidad, dando importancia a la capacidad de la vaca de limitar la respuesta inflamatoria (Herath et al., 2009). Se han observado mayores niveles de IL10 en

sangre periférica y lavado uterino a los 5, 22 y 40 días postparto en vacas con ESC, lo que podría llevar a una deficiente eliminación de bacterias y propiciar una inflamación persistente (Brodzki et al., 2015). Aunado a esto, se ha observado que las vacas que presentan retención placentaria y metritis, presentan una mayor concentración sérica en sangre de IL10, 15 días antes del parto y permanece de esta manera 15 días después del parto (Islam et al., 2013), lo cual es evidencia de la importancia de la modulación endógena de la respuesta inmune.

El diagnóstico de la endometritis subclínica se realiza mediante el conteo de neutrófilos polimorfonucleares en la luz uterina. Este conteo se puede realizar mediante tres técnicas: a través de células obtenidas del lavado uterino de bajo volumen, mediante citología exfoliativa y a través de biopsia (Kasimanickam et al., 2005; Barlund et al., 2008; De La Sota et al., 2014).

Las técnicas menos invasivas son la de lavado uterino con bajo volumen y la citología exfoliativa o citobrush. La evaluación microscópica de los frotis obtenidos por estas dos técnicas ha demostrado ser un método fiable y reproducible para la determinación de NPMN (Kasimanickam et al., 2004; Bogado y Opsoner, 2017). En una comparación entre citobrush y lavado uterino, se pudo observar un porcentaje mayor en la obtención de NPMN y menor tiempo para la toma de muestra mediante la técnica de citobrush (Apéndice A) (Kasimanickam et al., 2004; Bogado y Opsoner, 2017). Además, el equipo requerido para el procesamiento de la muestra es menor en citobrush que en lavado uterino de bajo volumen (Gilbert et al., 2005).

2.4 Mecanismos de defensa del útero

2.4.1 Consideraciones anatómicas

La mucosa del tracto reproductor está constantemente expuesta a microorganismos patógenos, pero cuenta con barreras físicas que limitan la entrada de éstos (Pérez et al., 1996). La vulva y esfínter vulvar son la primera barrera física contra la invasión. La segunda barrera física es el cuello del útero o cérvix, que se

encuentra al final de la cavidad vaginal. El cérvix posee células que secretan moco claro y fluido durante el éstro, con efecto antibacteriano. Durante la gestación, genera un tapón de moco para prevenir la entrada de microorganismos. A pesar de que la secreción cervical es antibacteriana, la vagina guarda una flora bacteriana residente, que no llega a generar problemas clínicos (Yellon et al., 2019).

2.4.2 Inmunidad uterina

La adherencia del embrión al endometrio uterino y la posterior sobrevivencia del feto dependen en gran medida de la regulación de los mecanismos inmunes. Durante la gestación el sistema inmune de la madre se ve disminuido, pero si el mecanismo de disminución persiste posterior al parto, se predispone a cursar por una enfermedad uterina. Aunque el desarrollo de la enfermedad depende del equilibrio entre el huésped, la inmunidad y la patogenicidad de las bacterias, algunos factores como, retención placentaria, partos distócicos, muerte fetal, partos gemelares y crías de gran tamaño, incrementan el riesgo de padecer enfermedades uterinas (Potter et al., 2010).

El sistema inmune innato es el principal encargado de la defensa del mamífero. Las células del endometrio presentan receptores tipo Toll (TLR), estos receptores reconocen DNA bacteriano, así como estructuras de la membrana como lípidos y lipopolisacáridos (LPS). La interacción entre el receptor y las estructuras bacterianas desencadena la liberación de moléculas pro inflamatorias, que atraen a macrófagos, principalmente a NPMN para la eliminación de bacterias. La función fagocítica, la expresión de genes y la migración de NPMN está asociada a cambios endocrinos y metabólicos (Sheldon et al., 2009).

2.5 Tratamiento para las enfermedades puerperales

El diagnóstico temprano de las enfermedades uterinas es de suma importancia para aminorar el impacto en el desempeño reproductivo y la rentabilidad

de la empresa lechera (Orrego et al., 2013). Los tratamientos para las enfermedades infecciosas bacterianas incluyen la terapia hormonal, la aplicación de antisépticos y antibióticos por vía local y sistémica (Lee et al., 2007). A continuación, se describen brevemente.

2.5.1 Tratamientos hormonales

El uso de tratamientos hormonales, para la prevención o tratamiento de enfermedades uterinas, ha sido ampliamente estudiado (LeBlanc, 2008). Una de las hormonas más utilizadas es la oxitocina, esta hormona genera contracciones musculares y ayuda a la evacuación del contenido uterino. Es dependiente de la sensibilización producida por los estrógenos, de manera que puede ser efectiva dentro de las 48 a 72 horas posteriores al parto (Youngquist et al., 2006). El ciproionato de estradiol, está indicado en el tratamiento de algunas patologías ováricas como quistes foliculares, cuerpo lúteo persistente, así como en piometra o retención placentaria (Overton et al., 2003). La Prostaglandina F2a o algún análogo de éste, se aplica cuando se encuentra un cuerpo lúteo presente en el ovario, induciendo el celo, mejorando la inmunidad. Ayuda a estimular las contracciones uterinas y provocar el vaciado del contenido uterino (expulsión bacteriana). En general el uso de los tratamientos hormonales está limitado a la presencia de estructuras ováricas, lo cual limita su uso y su efectividad (Overton et al., 2008; Sheldon et al., 2011^a).

2.5.2 Tratamientos antibióticos

La aplicación de tratamientos antibióticos en lavados uterinos es basta, pero tiene resultados contradictorios. Muchos son los autores que han realizado trabajos para evaluar la efectividad de estos (Overton et al., 2003; Risco, 2003). Para que el tratamiento antibiótico sea catalogado como “ideal”, éste debe eliminar la contaminación bacteriana, y no interferir ni disminuir la respuesta inmune, además de no presentar residuos en leche o carne (Martínez et al., 2006).

Los betalactámicos son antibióticos de uso común en el establo (penicilinas y cefalosporinas) que desestabilizan la pared celular de las bacterias Gram negativas y provocan lisis mediada por autolisinas (García-Hernández, 2011). *E coli* es una bacteria Gram negativa, de las principales bacterias aisladas del útero posterior al parto (Sheldon et al., 2008). Esta bacteria además de generar sinergia con otras bacterias para provocar infección, cuenta con mecanismos de defensa que le permiten evadir los mecanismos bactericidas de los antibióticos betalactámicos aplicados, como la generación de betalactamasas (García-Hernández et al., 2011). Por lo tanto, el tratamiento con betalactámicos por vía transcervical no está indicada.

La aplicación de aminoglucósidos (gentamicina, dihidroestreptomicina y neomicina) por vía intravenosa disminuye la cantidad de calcio total en sangre, por lo que se debe tener cuidado a la aplicación pues podrían contribuirse al aumento en la presentación de fiebre de leche (Crawford et al., 1977). Aunado a esto, algunos estudios reportan que la aplicación de aminoglucósidos, específicamente la gentamicina, reduce las contracciones uterinas, pudiendo estar contraindicado para el tratamiento de enfermedades puerperales uterinas (Crawford et al., 1977).

Las tetraciclinas son bacteriostáticos de amplio espectro más utilizados en el tratamiento de metritis en la vaca. No se inactiva en presencia de sangre o pus, son efectivos contra microorganismos gram positivo y gram negativo, así como aerobios y anaerobios. Algunas bacterias como *P. multocida*, *T pyogenes* y *Fusobacterium spp*, han desarrollado mecanismos de resistencia contra las tetraciclinas (Martínez et al., 2006), ya sea mediante plásmidos, disminución de la permeabilidad de la membrana al antibiótico formación de enzimas bacterianas que metabolizan el antibiótico (Pérez-Trallero et al., 2003). Los inconvenientes de su aplicación directa en útero son que favorece el crecimiento de *Candida albicans* y disminuye la fertilidad (Martínez et al., 2006).

El número de antibióticos que pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades en el ganado lechero es limitado. Además, existe una deficiencia en

la generación de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica. Aunado a esto, la creciente resistencia bacteriana a antibióticos ha generado nuevas dificultades en la lucha contra las infecciones (García-Hernández et al., 2011).

2.6 Resistencia bacteriana a antibióticos

La resistencia a antibióticos es un mecanismo de defensa de las bacterias, que se da de manera progresiva (Villanueva y Morales, 2017). Ya sea por la generación de mutaciones, o por la adquisición de plásmidos de otras bacterias que las hacen resistentes. Las bacterias pueden pasar de manera directa de animales a humanos o viceversa (en casos de zoonosis), o puede propagarse directamente al suelo, a los alimentos, y a los mantos acuíferos a través de la fertilización con estiércol (Wichmann et al., 2014). El uso inadecuado y excesivo de antibióticos, así como las malas prácticas de control contra infecciones, ha incrementado la inmunidad que tienen las bacterias a los tratamientos antibióticos (Medellín et al., 2011). La resistencia microbiana a antibióticos (RAM) es una problemática grave para la salud pública. Se predice que para el 2050 se incrementaran en 10 millones las muertes por RAM (O'Neill et al., 2016), como se observa en la figura 5.

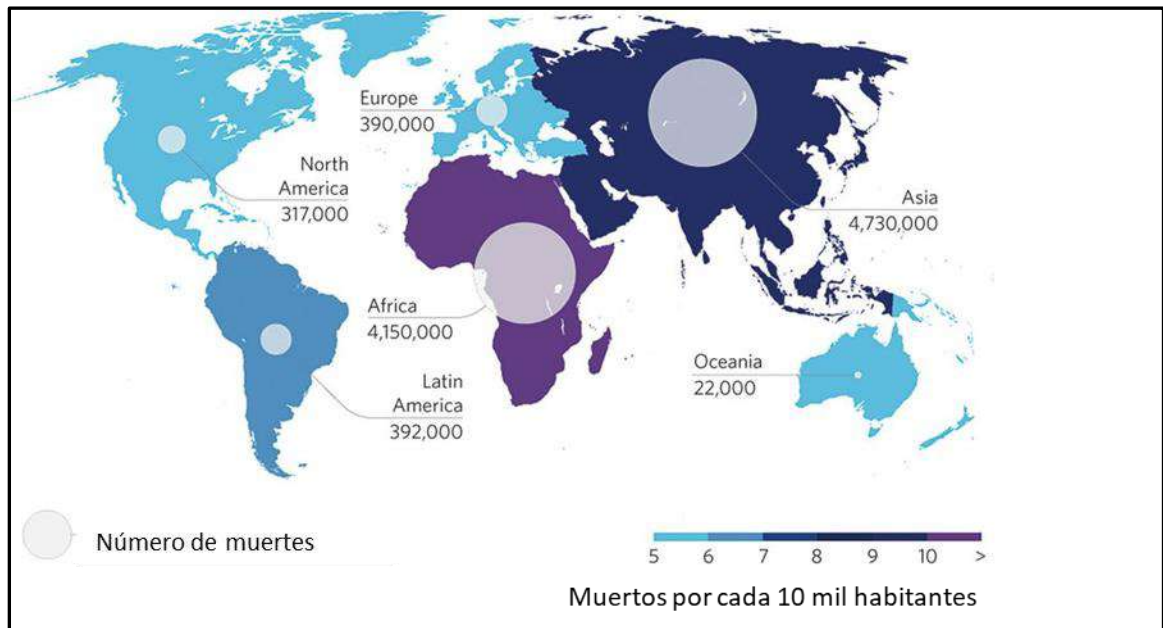


Figura 5. Proyección 2050 de muertes por resistencia bacteriana. Predicción de muertes por continente para el 2050, los colores representan la cantidad de muertes por cada 10 mil habitantes. Editado de O’Neill 2016,

El uso de antibióticos en medicina veterinaria contribuye de manera importante en la generación de resistencia bacteriana a antibióticos por diversas razones. Anteriormente eran ampliamente utilizados como promotores de crecimiento en animales de producción (Wichmann et al., 2014), aunque la tendencia de esta práctica es descendente, aún se lleva a cabo. Otra razón es porque los antibióticos son subdosificados o se suministran de manera profiláctica contra algunas enfermedades (Chowdhury et al., 2014). También, la industria lechera utiliza los antibióticos para prevenir mastitis, laminitis, problemas respiratorios o retención de placenta, entre otras enfermedades (Lhermie et al., 2018). Con relación a lo anterior, se estima que el sector ganadero representa el 80% del consumo total de antibióticos, y se espera que entre 2010 y 2030 el consumo se incremente en un 67% (O’Neill et al., 2016).

La resistencia bacteriana a los antibióticos se da de manera natural. Cuando las bacterias de una misma especie, presentan resistencia a un antibiótico determinado, transfieren la resistencia de manera vertical, eso les permite tener ventaja con respecto a otras cepas permitiendo su diseminación. Por otra parte, la resistencia adquirida se produce a través de mutaciones, y por transmisión de material genético entre diferentes bacterias, generándose la resistencia de manera horizontal. Por lo tanto, las bacterias pueden adquirir resistencia, aún sin haber estado en contacto con los antibióticos (Cantas et al., 2013).

Las bacterias utilizan diferentes mecanismos para evadir la eficacia de los antibióticos. Algunos de ellos, a través de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, a través de la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, modificando los canales de entrada, la producción de enzimas inactivantes de los antibióticos y modificando las proteínas en las que actúan los antibióticos (Pressman y Wabury, 2000; Fernández, et al., 2003).

La problemática de la resistencia bacteriana a antibióticos aunado a la falta de generación de nuevos productos por parte de la industria farmacéutica representa una oportunidad para mejorar las prácticas de bioseguridad. Además, este desafío representa un reto para generar estrategias alternativas al uso de antibióticos.

2.7 Ozono

El ozono es un gas de color azul claro de olor particular. Su nombre proviene del latín *Ozein* que significa olor. La fórmula química del ozono es O_3 , lo que significa que se compone de 3 átomos de oxígeno. Es un oxidante más fuerte que el O_2 , y es inestable en altas concentraciones y su descomposición resulta nuevamente en moléculas de oxígeno (O_2) más estables. Es de vital importancia para la vida en la tierra ya que tiene la capacidad de absorber longitudes de onda de la radiación UV solar (Bocci et al., 2006).

Hoy en día, su uso es amplio, ya sea en esterilización de salas de operaciones, purificación de agua de albercas y para diferentes procesos de esterilización en la industria. La molécula de ozono es altamente reactiva, presenta actividad bactericida, fungicida, antivírica, anti-levaduras y anti-protozoos. Es el tercer oxidante más poderoso después del flúor y el persulfato. Además, como terapia médica son raros los efectos negativos en la salud humana y de animales (Bocci et al., 2006).

La capacidad de acción del ozono es mayor en bacterias grampositivas. El ozono genera procesos oxidativos que dañan la capsula de las bacterias, a través de la actividad de las peroxidases y posteriormente la membrana celular. Los virus envueltos son neutralizados tras la destrucción de los lípidos en la cápside, y el bloqueo de su replicación. La capacidad de producir hidróxidos de proteínas e hiperhidróxidos, anula a los virus desnudos (Megahed et al., 2018).

El ozono tiene la capacidad de reaccionar con la mayoría de las sustancias orgánicas e inorgánicas, hasta llegar a su oxidación completa, formando óxidos de carbono, óxidos superiores y finalmente agua. Su acción es selectiva sobre los enlaces dobles de las sustancias biológicas, de esta manera, reaccionan con proteínas, aminoácidos y ácidos grasos insaturados, que forman parte de las membranas celulares y de los complejos lipoproteicos en plasma (Tapia y Martínez-Sánchez, 2012).

Sus mecanismos de acción, están fuertemente ligados a la producción de cuatro especies fundamentales. Al reaccionar con los fosfolípidos de la membrana forma ozónidos, aldehídos, peróxido de hidrogeno y peróxidos. Cuando el ozono entra en contacto con fluidos biológicos, se disuelve en el agua contenida en estos, y reacciona en pocos segundos. Los antioxidantes presentes en los líquidos de los fluidos biológicos, agotan la mayor parte de la dosis de ozono. Pero si la concentración aplicada es la correcta permite la formación de especies reactivas a oxígeno (Tapia y Martínez-Sánchez, 2012).

2.7.1 Terapia con ozono

Se ha demostrado que el ozono actúa sobre el sistema inmune. Tras la aplicación de ozono en diferentes concentraciones en sangre, se observó la liberación de interferones: alfa (INF- α), beta (IN- β) y gamma (INF- γ). Factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), factor de crecimiento transformante beta (FGT- β) factor estimulante de colonias granulocito-monocito (FEC-GM) e interleucinas IL-6, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10. Cada una de las IL tienen funciones inmunomoduladoras. La IL-6 y FNT- α son factores proinflamatorios, mientras que IL-10 y FEC-GM son factores antiinflamatorios (Larini et al., 2005; Bocci et al., 2006).

El ozono actúa sobre la membrana de las células inmunes, a través de la ozonolisis de los ácidos grasos insaturados. En una reacción rápida, se rompen los enlaces dobles de los ácidos grasos insaturados, para generar peróxidos hidrofílicos de cadena corta (peróxido de hidrógeno, aldehídos y ozónidos). Estas moléculas activan proteínas cinasas, que fosforilan el factor inhibidor específico (I κ B) dentro de la célula. I κ B se encuentra unido al factor nuclear kappa B (FN-kB) (Díaz, 2013). FN-kB juega un papel importante en la regulación de la inmunidad innata, así como en la adaptativa. FN-kB regula la transcripción en una gran cantidad de genes, entre ellos los de péptidos antimicrobianos, citoquinas, quimiocinas, proteínas de respuesta al estrés y proteínas anti apoptóticas. Es esencial para la activación de linfocitos, y para el montaje de la respuesta inmune. La regulación de esta proteína es asociada con enfermedades inflamatorias (Li et al., 2002).

Se han desarrollado algunos estudios de la influencia de la aplicación de ozono en diferentes epitelios y en diferentes soluciones, obteniendo resultados muy reveladores, estudios han observado, que al aplicarse ozono por vía inhalada induce actividad inflamatoria y liberación de factores quimiotácticos en pulmones de ratones, monos y puercos de guinea (Driscoll et al., 1993; Miller et al., 2017; Wicher et al., 2017). Se ha demostrado que, al aplicar ozono inyectado a ratones con osteoartritis, aumenta la expresión de IL-10, y una disminución en la síntesis de FNT α , factores antiinflamatorios y pro inflamatorios, respectivamente (Asadi et al.,

2018). Al aplicar solución salina ozonizada inyectada, en el tracto reproductor de ratas con enfermedad inflamatoria pélvica, (caracterizada por la infección e inflamación del tracto reproductor de la hembra), se observó, la disminución en la síntesis de IL-6, FNT- α , y el aumento en la síntesis de IL-2 (Wei et al., 2018), todos estos estudios implican un efecto inmunomodulador generado por la aplicación de ozono.

2.7.2 Ozonoterapia en buiatría

El uso de la terapia de ozono en animales se remonta a más de 30 años. Se han realizado pruebas utilizando ozono con diferentes productos para el tratamiento de enfermedades con buenos resultados. El uso de la mezcla de ozono en diversos productos como cremas, aceites naturales, perlas de parafina o la aplicación directa del gas, se ha utilizado para tratar infecciones en piel, como cicatrizante, o para control bacteriano (Travagli et al., 2009).

La terapia de ozono se ha utilizado para prevenir o tratar enfermedades en ganado Holstein y Simmental. Para tratamiento de urovagina, en vacas lecheras, en donde a través de la aplicación de ozono en spray por 2 a 3 segundos, se estimula la cicatrización y regeneración del tejido, reduciendo los días abiertos y mejorando la tasa de concepción (Zobel, et al, 2012). En el tratamiento preventivo de enfermedades uterinas durante el puerperio. En donde se aplicaron tratamientos de ozono en spray y en perlas de parafina a las 24 y 48 horas después del parto. Mejorando tasa de servicio por concepción de 20.4%, 27.8% en animales tratados con solución salina ozonizada y perlas de ozono y 14.6% el grupo control (Djuricic et al., 2012). En otro modelo experimenta en ganado Simmental, 20 ml de solución salina ozonisada al grupo tratamiento y se aplicó 20 ml de solución salina al grupo control. El tratamiento se aplicó a las 6 y a la 24 horas postparto. Concluyendo en la disminución del periodo de días abiertos de 75.47 y 98.03 entre el grupo tratado y el grupo control respectivamente. Se observó la disminución de la cantidad de

inseminaciones a la preñez en 1.68 contra 2.42 entre el grupo tratado y el grupo control respectivamente (Zobel et al, 2014).

Un estudio realizado con 200 vacas Simmental, (diagnosticadas con retención de placenta, 12 horas posteriores al parto), a las que se les aplicó ozono en spray, en las primeras 12, 48 y 36 horas después del parto. Se observó que a las vacas que se les aplicó el tratamiento, sus indicadores reproductivos (días abiertos al primer servicio y días abiertos a la preñez) no eran diferentes con las vacas que presentaban un puerperio normal (Djuricic et al., 2012b ; Zobel y Tkalčić, 2013).

La aplicación de ozono en gas, directo de una maquina generadora de ozono de uso medico, en vacas con mastitis clinica, dio como resultado que el 16% de las vacas tratadas con ozono, no requirieron tratamiento antibiótico para su recuperación (Ogata y Nagahata, 2000).

Para el tratamiento de enfermedades uterinas, se comparó la efectividad de un preparado comercial de ozono, y la aplicación de gentamicina en lavados uterinos, en vacas que presentaban secreciones uterinas anormales. Se observo que el preparado de ozono, fue mas efectivo en el control del porcentaje de infección por *E. coli*, *F. necrophorum* y *St. Pyogenes*, comparado con tratamiento de gentamicina, que solo fue efectivo contra *T. pyogenes* (Durrani et al., 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso de la terapia con ozono ha demostrado tener efectos benéficos en la salud uterina y mejora indicadores del desempeño reproductivo. Sin embargo, sus mecanismos de acción a nivel de endometrio no han sido completamente dilucidados, por ejemplo, como modulador de la respuesta inmune. Además, su posible efecto en la prevención de la endometritis subclínica no ha sido demostrado aún, efecto que podría presentarse dadas sus propiedades bactericidas.

IV. HIPÓTESIS

La aplicación de ozono por vía transcervical incrementa la proporción de neutrófilos polimorfonucleares en el endometrio y previene la endometritis subclínica.

V. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la aplicación de ozono sobre la migración de neutrófilos polimorfonucleares hacia el endometrio y si promueve un efecto preventivo para la presentación de endometritis subclínica.

5.2 Objetivos específicos

Determinar el efecto de la aplicación de ozono sobre la migración de neutrófilos polimorfonucleares hacia el endometrio.

Determinar el efecto de la aplicación de ozono sobre la prevención de la endometritis subclínica.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación y condiciones climáticas

El presente estudio se realizó entre los meses de agosto y octubre de 2019 en un establo comercial ubicado en la Estancia, municipio de San Juan del Río, Querétaro, México (20°25'34.94" N 100° 03'37.00" O). Durante la realización del estudio (agosto-octubre 2019) la temperatura promedio osciló entre los 16 y 19° C, con máximas de 31° C, mínimas de 12° C y una precipitación pluvial promedio de 542.9 mm.

6.1.1 Manejo general del establo

Se ofreció una ración total 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 (7:00 h) y con acceso a libertad. Durante el día, el alimento fue repetidamente barrido hacia el comedero para estimular el consumo. Las vacas estuvieron alojadas durante todo el estudio en corrales techados y asoleadero de tierra con acceso libre. Cada corral contaba con echaderos individuales y camas con arena sílica. La limpieza de los corrales se realizó una vez al día a las 13:00 h.

6.2 Producción de solución salina ozonizada

Para producir la solución salina ozonizada (SSO3), se utilizó un equipo ozonificador de grado médico (Oxyzonic System Medic, EDE Ozone). En un frasco lavador de gases de 250 ml se realizó el pase de ozono a una concentración de 70.09 µg/ml con una tasa de paso de oxígeno de grado médico a 0.5 L/min con una piedra difusora de 25 mm. Se ozonificaron 150 ml de solución salina fisiológica al 0.9% por un minuto. La SSO3 se aplicó entre los 10 a 15 min posteriores a la ozonificación para una dosis de ozono residual de (5.6 ± 0.5 ppm). La concentración

de ozono residual se determinó en el laboratorio de forma indirecta con la técnica estándar de titulación por yodometría (Apéndice B).

6.3 Experimento 1

6.3.1 Diseño experimental

Se utilizaron 38 vacas Holstein de primera lactación, de las cuales se monitoreo el puerperio, registrando las vacas que presentaron metritis durante los primeros 15 días postparto. Las vacas enfermas fueron tratadas con protocolo de antibiótico de amplio espectro y desinflamatorio protocolo del establo. Se clasificó a las vacas como SAN cuando no presentaron metritis o alguna enfermedad y ENF a las que recibieron tratamientos antibióticos por metritis.

Para el tratamiento se dividió a las vacas en 2 grupos, 19 vacas en tratamiento (SSO3) y 19 vacas control (CTRL), las vacas SAN y ENF se distribuyeron entre los grupos CTRL y SSO3 de manera aleatoria.

El tratamiento con SSO3 consistió en la aplicación por vía transcervical, de 50 ml de solución salina fisiológica al 0.9% al grupo CTRL, y 50 ml de solución salina ozonizada al grupo SSO3 (5.6 ± 0.5 ppm).

Se aplicó un protocolo de pre-sincronización consistente en dos aplicaciones de 25 mg de dinoprost con diferencia de 14 días, iniciando en promedio a los 18 días posparto. Doce días posteriores a la última aplicación de dinoprost, se tomó una muestra citológica del endometrio mediante la técnica de citobrush (Apéndice A) y se aplicaron los tratamientos experimentales. Cuarenta y ocho horas después de aplicados los tratamientos se tomaron de nuevo muestras citológicas mediante la misma técnica.

Con las muestras obtenidas (pre y postratamiento) se montaron laminillas, las cuales se procesaron con hemocolorante rápido marca Hycel®. Las muestras se analizaron en el microscopio a 400X, se contabilizaron 200 células y se registró

la cantidad de NPMN. Solo una vaca fue descartada del estudio por presentar endometritis subclínica (>10% NPMN).

Las vacas a las que se les aplicaron los tratamientos experimentales no presentaban secreciones uterinas sugerentes de infección o fiebre; siendo diagnosticadas como clínicamente sanas por médicos veterinarios encargados de la operación del establo.

La figura 6 muestra en una línea de tiempo el protocolo utilizado para el diseño experimental 1.

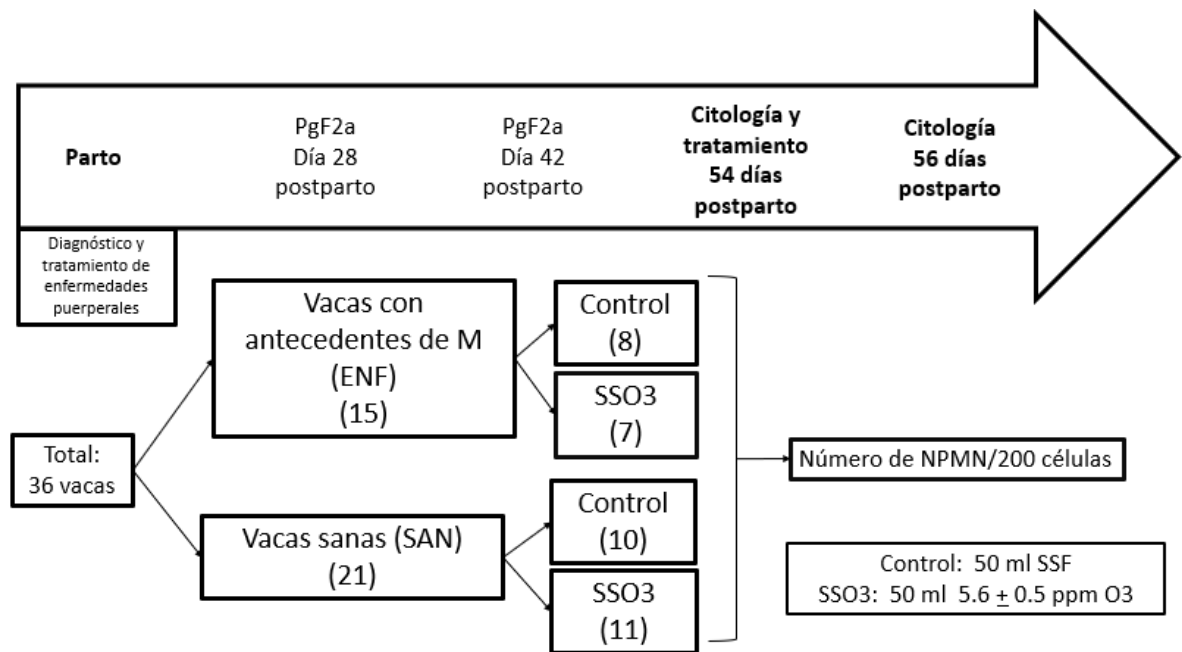


Figura 6. Diseño experimental 1. Protocolo de sincronización, tratamiento y toma de muestra para conteo de neutrófilos polimorfonucleares. NPMN, neutrófilos polimorfonucleares; SAN, vacas sin antecedentes de metritis; ENF, vacas con antecedentes de metritis; CTRL, grupo control con solución salina; SSO3, grupo con solución salina ozonizada (50 ml, 5.6±0.5 O3 ppm); M, metritis. Entre paréntesis se muestra el número de vacas por grupo.

6.3.2 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SAS versión 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza con un diseño completamente al azar con arreglo factorial

(antecedentes de enfermedades puerperales (ENF o SAN) x tratamiento con solución salina sola u ozonizada (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 ($\log Y = \log(Y+1)$). Finalmente, la comparación entre medias se llevó a cabo utilizando la opción PDIFF. Se estableció un valor de significancia $p < 0.05$ y un valor de $P < 0.1$ como indicativo de tendencia.

6.4 Experimento 2.

6.4.1 Diseño experimental

Se utilizaron 26 vacas de raza Holstein de primera lactación. Las 26 vacas se dividieron en 2 grupos de manera aleatoria; grupo control CTRL y grupo tratamiento SSO3.

Al grupo CTRL se le aplicó por vía transcervical 50 ml de solución salina fisiológica al 0.9% y al grupo tratamiento se le aplicó 50 ml de solución salina ozonizada (5.6 ± 0.5 ppm). Los tratamientos correspondientes se aplicaron en 2 ocasiones, la primera entre los 7-14 días posteriores al parto y la segunda a los 7 días posteriores a la primera aplicación.

Se tomaron muestras citológicas mediante la técnica de citobrush a los 30 días posteriores al parto para diagnosticar endometritis subclínica (Apéndice A). Las vacas cuyas muestras tuvieron $\geq 6\%$ de neutrófilos polimorfonucleares en el análisis citológico, fueron diagnosticadas positivas a endometritis subclínica.

Las vacas a las que se les aplicaron los tratamientos no presentaban secreciones uterinas sugerentes de infección o fiebre; siendo diagnosticadas como clínicamente sanas por médicos veterinarios encargados de la operación del establo.

Figura 7 muestra en una línea de tiempo el protocolo utilizado para el diseño experimental 2.

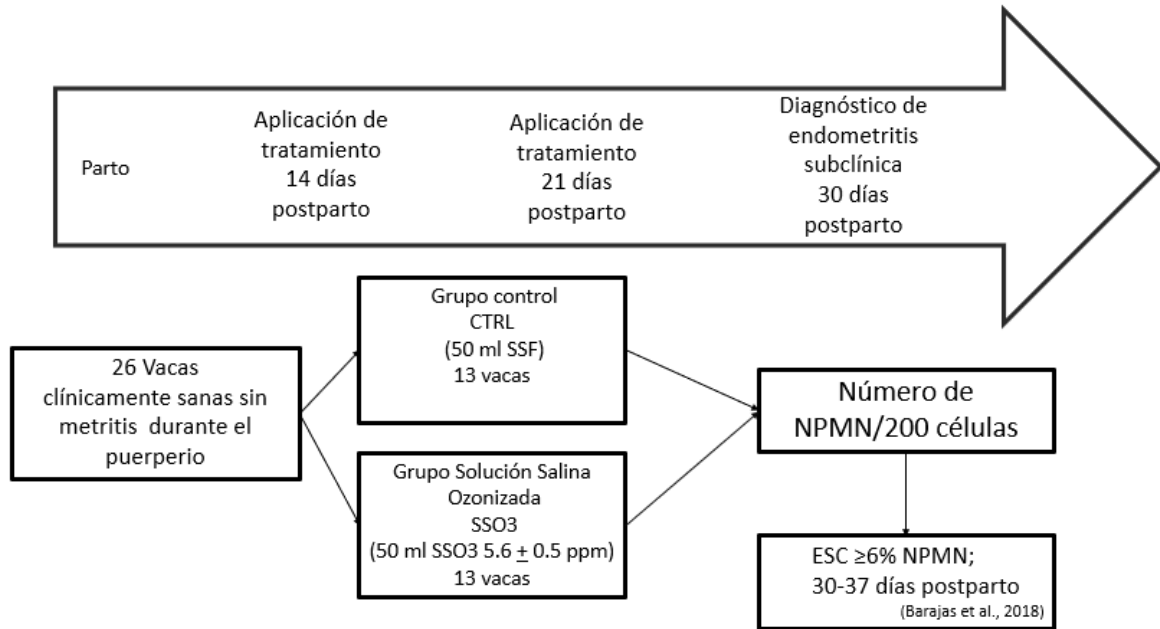


Figura 7. Diseño experimental 2. Línea del tiempo a partir del parto, se indica la aplicación de tratamiento con diferencia de 7 días y el diagnóstico de endometritis subclínica. CTRL, grupo control con solución salina; SSO3, grupo con solución salina ozonizada (50 ml, 5.6±0.5 O3 ppm). Entre paréntesis se muestra el número de vacas por grupo.

6.4.2 Análisis estadístico

Para determinar si existieron diferencias entre el porcentaje de vacas con ESC se utilizó la prueba exacta de Fisher con el procedimiento LOGISTIC de SAS versión 9.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Para determinar el riesgo que tuvo una vaca para desarrollar ESC se obtuvo la razón de momios entre grupos experimentales a través de un análisis de regresión logística simple. 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.

VII. RESULTADOS

7.1 Resultados experimento 1

En el cuadro 1 se muestra el número de NPMN endometriales/200 células en los diferentes grupos del experimento 1; divididas en vacas con antecedentes de enfermedad (ENF) y sin antecedentes de enfermedad (SAN) y subdividido en grupos CTRL y SSO3.

Cuadro 1. Número de neutrófilos polimorfonucleares endometriales/200 células por grupo para el experimento 1.

Grupo	Tratamientos	N	Media ± EE	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
SAN	CTRL	10	0.10 ± 0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
SAN	SSO3	11	1.81 ± 0.80	0.00	0.00	1.00	2.00	7.00
ENF	CTRL	8	17.0 ± 9.58	0.00	1.50	4.00	24.00	77.00
ENF	SSO3	7	10.42 ± 8.18	0.00	0.00	2.00	9.00	59.00

SAN, vacas sin antecedentes de metritis; ENF, vacas con antecedentes de metritis; CTRL, grupo control con solución salina; SSO3, grupo con solución salina ozonizada (50 ml, 5.6±0.5 O3 ppm); N, observaciones por grupo; EE, error estándar; Min, mínimo; Q1, primer cuartil; Q3, tercer cuartil; Max, máximo.

Los resultados se indican con las variables sin transformar para facilitar su interpretación. Dentro del grupo de vacas sin antecedentes de enfermedad puerperal (SAN), no hubo diferencias estadísticas en el número de NPMN endometriales ($P=0.8$) entre grupos CTRL y SSO3 (0.1 ± 5.0 y 1.8 ± 4.8 , respectivamente). Dentro del grupo de vacas con antecedentes de enfermedad puerperal (ENF), tampoco hubo diferencias estadísticas ($P=0.4$) entre grupos CTRL y SSO3 (17.0 ± 5.6 y 10.4 ± 6.0). Sin embargo, comparando vacas dentro del grupo con solución salina (CTRL), las vacas con antecedentes de enfermedad puerperal (ENF) tuvieron mayor número de NPMN (17.0 ± 6) comparado con las vacas del grupo sin antecedentes de enfermedad puerperal (SAN) (0.1 ± 5) ($P<0.05$). Por otra parte, dentro del grupo de vacas con solución salina ozonizada (SSO3), no hubo

diferencias estadísticas entre los grupos SAN y ENF (1.8 ± 5 y 10.4 ± 6 , respectivamente; $P=0.26$) (Figura 8).

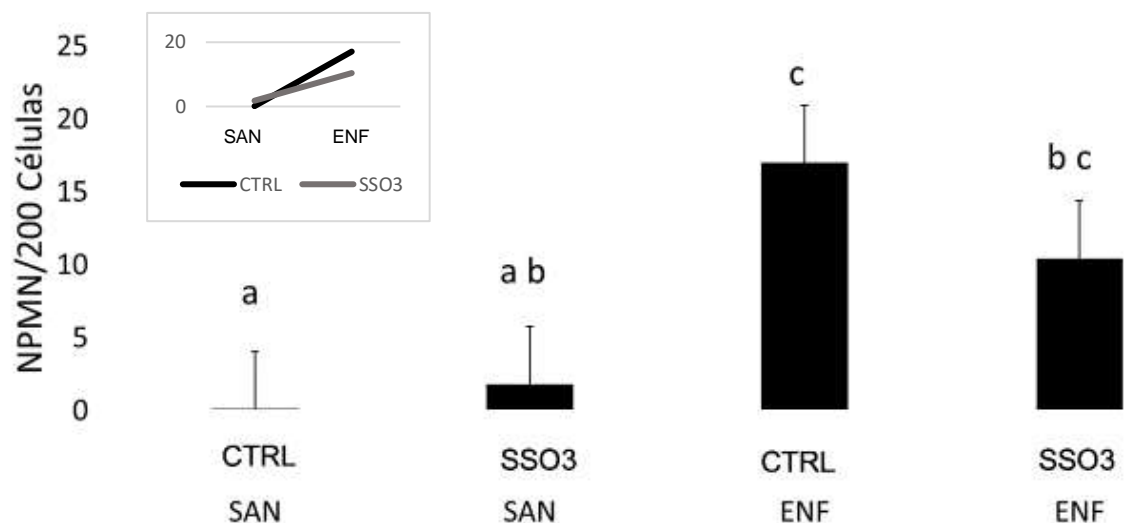


Figura 8. Promedio de neutrófilos polimorfonucleares por grupo en citologías endometriales 48 horas después de aplicado el tratamiento. Las líneas horizontales indican el error estándar; a, b, c, columnas con diferente letra indica diferencias estadísticas $P < 0.05$. El recuadro interior es otra representación del efecto de la interacción; se destaca que en vacas ENF-SSO3, la respuesta en el aumento de NPMN fue menor comparado con ENF-CTRL; lo cual sugiere un posible efecto antiinflamatorio.

7.2 Resultados experimento 2

Se presenta el número de neutrófilos polimorfenucleares endometriales/200 células por grupo experimental (cuadro 2), así como los porcentajes de vacas Con y Sin ESC (cuadro 3).

Cuadro 2. Número de neutrófilos polimorfonucleares endometriales/200 células por grupo para el experimento 2.

Grupo	N	Media \pm EE	Min	Q1	Mediana	Q3	Max
CTRL	13	14.38 \pm 8.34	0.00	0.00	6.00	11.00	110.00
SSO3	13	17.08 \pm 8.00	0.00	2.00	5.00	17.00	107.00

CTRL, grupo control con solución salina; SSO3, solución salina ozonizada (50 ml, 5.6 ± 0.5 O₃ ppm); N, observaciones por grupo; EE, error estándar; Min, mínimo; Q1, primer cuartil; Q3, tercer cuartil; Max, máximo.

Cuadro 3. Porcentaje de vacas con y sin endometritis subclínica por grupo.

Grupo	Vacas con ESC	
	Si	No
CTRL	15.4% (2/13)	84.6% (11/13)
SSO3	46.2% (6/13)	53.8% (7/13)

CTRL, grupo control con solución salina; SSO3, solución salina ozonizada (50 ml, 5.6±0.5 O3 ppm); SI, porcentaje de vacas con ESC, NO, porcentaje de vacas sin ESC; ESC, endometritis subclínica.

En el cuadro 4 se presenta el número de neutrófilos polimorfonucleares endometriales/200 células entre grupos experimentales para vacas diagnosticadas con (SI) o sin (NO) endometritis subclínica.

Cuadro 4. Conteo de neutrófilos polimorfonucleares en vacas con y sin endometritis subclínica, por grupo y total.

Grupo	Conteo de NPMN en vacas con y sin ESC por grupo y total		
	SI	NO	TOTAL
CTRL	71.0 ±39.0	4.1 ± 1.5	14.4 ± 8.3
SSO3	34.7 ±14.7	2.0 ±0.7	17.1 ± 8.0

CTRL, grupo control con solución salina; SSO3, solución salina ozonizada (50 ml, 5.6±0.5 O3 ppm); SI, conteo de NPMN de vacas con ESC ± EE, NO, conteo de NPMN de vacas sin ESC ± EE; ESC, endometritis subclínica; EE, error estándar.

El porcentaje de vacas con ESC al día 30 fue de 30.7%. 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). El análisis de regresión logística indicó una tendencia estadística (P=0.1); las vacas que recibieron el tratamiento con ozono (SSO3) tuvieron 4.7 veces mayor riesgo (0.73-30.3, LC95%) de desarrollar ESC que las vacas que recibieron únicamente solución salina (CTRL).

VIII. DISCUSIÓN

Durante el puerperio, el útero es invadido de manera natural por bacterias mientras que la capacidad de la vaca para montar una respuesta inmune es determinante entre el desarrollo de una infección o su control (Santos y Bicalho, 2012; Dervishi et al., 2016). En el presente trabajo, reportamos que las vacas con antecedentes de metritis (ENF) presentan mayor respuesta en el número de NPMN después de aplicar los tratamientos experimentales al día 54 postparto en comparación con las vacas sin antecedentes de metritis (SAN). Aunado a esto, un tratamiento propuesto para la endometritis subclínica es la aplicación de solución salina fisiológica aplicada en lavados uterinos a pesar de que ésta genera un ligero efecto irritante (Dini et al., 2015). Por otra parte, se ha reportado que existe una mayor cantidad de interleucinas inflamatorias en el útero de vacas que presentan endometritis clínica, endometritis subclínica y antecedentes de distocia (Ill-Hwa et al., 2014; Healy et al., 2014). Estudios adicionales realizaron análisis transcriptómicos en vacas a los 21 días post parto y demostraron que las vacas con antecedentes de endometritis clínica presentan un mayor nivel de IL-17A (Foley et al., 2015), la cual a través de la vía IL-8 estimula el reclutamiento de células inflamatorias (Hirata et al., 2008; Ahn et al., 2015). Considerando en conjunto todo lo anterior, una posible explicación a la mayor respuesta en el número de NPMN en vacas con historial de metritis y endometritis clínica pudieran radicar que las células endometriales de vacas con antecedentes de enfermedad tienen una mayor sensibilidad a estímulos irritantes y, por lo tanto, presentan una mayor respuesta inflamatoria observada en el incremento en el número de NPMN tanto en el grupo CTRL como en SSO3.

Por otra parte, en diferentes estudios se ha demostrado que el ozono tiene un efecto inmunomodulador (Díaz et al., 2013; Asadi et al., 2018; Larini et al., 2005). Los resultados de este trabajo indican que en las vacas del grupo ENF-SSO3 la cantidad de NPMN no fue diferente de las vacas SAN-SSO3. En estudios previos

realizados en monos y ratones se reportó que al aplicar ozono inhalado se incrementó la cantidad de factores quimiotácticos liberados por macrófagos alveolares para el reclutamiento de neutrófilos (Driscoll et al., 1988; Driscoll et al., 1993); es decir, obteniendo un efecto proinflamatorio. Estos trabajos fueron fundacionales para los experimentos planteados en este proyecto, sin embargo, los resultados que aquí se presentan son contrarios a los esperados; efecto antiinflamatorio. En estudios recientes se aplicó terapia con ozono en articulaciones de ratas con osteoartritis; en respuesta se observó un incremento en IL-10 (interleucina antiinflamatoria) y la disminución del FNT- α (Asadi et al., 2018). En otro estudio reciente realizado en ratas a las que se les indujo enfermedad inflamatoria pélvica, se les aplicó terapia con ozono en concentraciones de 45 μ g/ml y 60 μ g/ml, observándose una disminución en la cantidad de IL-6 y FNT α (Wei et al., 2018). Considerando todo lo anterior, en el presente estudio la terapia con ozono no tuvo un efecto proinflamatorio en vacas con antecedentes de metritis. Por lo contrario, la terapia administrada pareciera ejercer un efecto antiinflamatorio, el cual podría estar asociado a una mayor expresión de factores antiinflamatorios (IL-10) o bien a una menor expresión de factores proinflamatorios (FNT- α) (Asadi et al., 2018; Wei et al., 2018), hipótesis pendiente de ser desafiada.

Contrario a la hipótesis planteada, el ozono no previno la ESC; los resultados demuestran que la aplicación del tratamiento preventivo incrementó la proporción de vacas con ESC. No queda claro el porqué de este resultado, sin embargo, una posible explicación pudiera radicar en una baja capacidad bactericida del protocolo utilizado y a su presunto efecto inmunomodulador como el observado en el primer experimento. Un estudio en donde se comparó la capacidad del sulfato de gentamicina (Gentafar 10%) y el de un preparado comercial de ozono (Sanofarm®) en aplicación intrauterina para el control bacteriano, demostró que el ozono tiene una mejor capacidad para controlar la carga bacteriana debido a su conocido efecto bactericida (Durrani et al., 2017). En otro estudio se desafió la capacidad del ozono para ejercer control bacteriano en donde se aplicó agua ozonizada a diferentes

superficies que fueron expuestas a contaminación fecal. Los resultados indicaron que tras la aplicación de agua ozonizada en 4 y 9 ppm durante un minuto, se logró disminuir la carga patogénica a un nivel seguro ($3.6 \log_{10}$ patógenos a base de estiércol) (Megahed et al., 2018). Aunado a esto, los resultados obtenidos en el primer experimento sugieren la existencia de un posible efecto antiinflamatorio en el útero con el protocolo utilizado en el presente estudio. Tomando en cuenta todo lo anterior, una posible explicación al resultado del incremento en la proporción de vacas con ESC en el grupo tratado es la siguiente: es posible que la aplicación del tratamiento con SSO₃ no lograra controlar la carga bacteriana, sin embargo, pudo haber ejercido un efecto inhibitorio en la respuesta inmune. Al no haber un control bacteriano total junto con una disminución en la respuesta inmune, se pudo haber inducido una mayor proliferación bacteriana lo cual derivó en una respuesta inmune más agresiva. Finalmente, como es sabido, una respuesta inmune descontrolada es el primer paso en la patogenia de la ESC. Si bien, esta explicación es una posibilidad remota, se fundamenta en que el protocolo utilizado (dos dosis de 5.6 ± 0.5 ppm en 50ml a intervalo de 7 días) no fuera capaz de controlar la carga bacteriana.

Los efectos benéficos sobre la salud uterina del tratamiento preventivo con ozono han sido demostrados ampliamente (Djuricic et al., 2012b; Zobel et al., 2014; Constantin y Bîrțoiu, 2016). En esos estudios, se utilizó una presentación comercial de ozono disuelto en espuma (Riger Spray®, Novagen, Italy), la cual no está disponible en el mercado nacional. Sin embargo, en México se cuenta con generadores de ozono de grado médico para experimentar con un tratamiento a base de solución salina ozonizada. Por cierto, hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer estudio que desafía la hipótesis de que el tratamiento con ozono disuelto en solución salina puede ser una opción para mejorar indicadores del desempeño reproductivo. Aunado a esto, el presente proyecto es el primer intento para obtener un tratamiento preventivo. Las observaciones en campo de experimentos en curso en nuestro laboratorio, muestran que 24 horas posteriores a

la aplicación del tratamiento en una dosis única (50 ml, 5.6±0.5 O3 ppm) en vacas enfermas con metritis, presentan una notable mejoría evaluada a través de las secreciones uterinas. Sin embargo, después de unos días vuelven a recaer, lo cual sugiere la necesidad de incrementar la frecuencia en la aplicación de los tratamientos (resultados no publicados). A pesar de esto, este primer experimento servirá de base para el desarrollo de nuevos protocolos que impliquen diferente número de aplicaciones y la evaluación de diferentes dosis. También quedará pendiente determinar el efecto del tratamiento sobre la salud uterina evaluando el impacto que pudiera tener sobre los indicadores del desempeño reproductivo.

IX. CONCLUSIÓN

La aplicación de solución salina ozonizada con el protocolo utilizado en el presente estudio no incrementa la proporción de NPMN en el endometrio; el disminuir la respuesta inflamatoria en vacas con antecedentes de metritis sugiere que el tratamiento pudiera tener un efecto antiinflamatorio. Además, la aplicación del protocolo preventivo de SSO3 incrementó el riesgo de ESC en vacas sin antecedentes de enfermedad puerperal, lo cual pudiera ser explicado a partir del efecto regulador a la baja de la respuesta inmune local.

X. BIBLIOGRAFÍA

Ahn , S. H., Edwards, A. K., Singh, S. S., Young, S. L., Lessey, B. A. (2015). IL-17A contributes to the pathogenesis of endometriosis by triggering proinflammatory cytokines and angiogenic growth factors. *J Immunol*, 195(6), 2591–600.

Armengol, R., Fraile, L. (2018). Descriptive study for culling and mortality in five high-producing Spanish dairy cattle farms (2006-2016). *Acta Veterinaria Scandinavica* , 60(1), 45.

Asadi, S., Farzanegi, P., Azarbayjani, M. A. (2018). Effect of exercise, ozone and mesenchymal stem cells therapies on expression of IL-10 and TNF- α in the cartilage tissue of overweight rats with knee osteoarthritis. *Social Determinants of Health*, 4(3), 162-170.

Bajcsy, Á. C; Szenci, O., Doornenbal, A., Van Der Weijden, G. C., Csorba, C., Kocsis, L., Taverne, M. A., (2005). Characteristics of bovine early puerperal uterine contractility recorded under farm conditions. *Theriogenology*, 64(1), 99-111.

Barajas Merchan, J. L., Hernández Cerón, J., García Alfonso, A., Martínez Bárcenas, E., Juárez López, N. O., Bedolla Alva, M. A., Luzbel de la Sota, R. (2018). Endometritis subclínica y tasa de gestación en vacas lecheras en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(1), 135-146.

Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L., Palmer, C. W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy. *Theriogenology*, 9(6), 714-723.

Bocci, V. A. (2006). Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. *State of the Art. Archives of Medical Research*, 37, 425-435.

Boer, M., Buddle, B. M., Heuer, C., Hussein, H. Z. (2015). Associations between intrauterine bacterial infection, reproductive tract inflammation, and

reproductive performance in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 83(9), 1514-1524.

Bogado, P., Opsoner, G. (2017). Diagnosis and treatment of postpartum uterine diseases in dairy cows: a review with emphasis on subclinical endometritis. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 7(1), 29-40.

Brodzki, P., Kostro, K., Brodzki, A., Wawron, W., Marczuk, J. (2015). Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum. *Theriogenology*, 84(1), 1.

Cantas, L., Shah, S. Q. A., Cavaco, L. M., Manaia, C. M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., Sørum, H. (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 4, 96.

Chamba Ochoa H. R., Benítez González, E. E., Pesántez Campoverde, M. T. (2017). Factores predisponentes para la enfermedad quística ovárica bovina y su efecto en la eficiencia reproductiva. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(35), 17-28.

Chowdhury, P. M., McKinnon, J., Wyrsh, E., Hammond J. M., Charles, I. G., Djordjevic, S. P. (2014). Genomic interplay in bacterial communities: implications for growth promoting practices in animal husbandry. *Frontiers in Microbiology*, 5, 394.

Crawford, L. M., Campbell, D. L., Harvey, T. (1977). Hypocalcemic effect of aminoglycoside antibiotics in the dairy cow. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 41(3), 251.

Credille, B. C., Woolums, A. R., Giguere, S., Robertson, T., Overton, M. W., Hurley, D. J. (2014). Prevalence of bacteremia in dairy cattle with acute puerperal metritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(5), 1606-1612.

Csaba B. Á., Szenci O., Doornenbal, A., C. van der Weijden, G. C., Csorba, C., Kocsis, L., Szucs, I., Ostgard, S., Taverne, M. (2004). Characteristics of bovine early puerperal uterine contractility recorded under farm conditions. *Theriogenology*, 64, 99-111.

De La Sota, R. L., Madoz, L. V., Jaureguiberry, M., Dominguez, G., Migliorisi, A. L., Albarracin, D., Alvarez, E. (2014). Endometritis sub clínica en vacas de tambo: diagnóstico, prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva. *Actas VII Jornadas Taurus*, 105-111.

Dervishi, E., Zhang, G., Hailemariam, D., Goldansaz, S. A., Deng, Q., Dunn, S. M., & Ametaj, B. N. (2016). Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 104, 30-39.

Di Mauro, R., Cantarella, G., Bernardini, R., Di Rosa, M., Barbagallo, I., Distefano, A., Longhitano, L., Vicario, N., Nicolosi, D., Lazzarino, G., Tibullo D., Gulino, M. E., Spampinato, M., Avola, R., Li Volti, G. (2019). The biochemical and pharmacological properties of ozone: the smell of protection in acute and chronic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 634.

Díaz Luis, J., Macías Abraham, C., & Menéndez Cepero, S. (2013). Efecto modulador de la ozonoterapia sobre la actividad del sistema inmune. *Revista Cubana de Hematología Inmunología y Hemoterapia*, 29(2), 143-153.

Dini, P., Farhoodi, M., Hostens, M., Van Eetvelde, M., Pascottini, O. B., Fazeli, M. H., Opsomer, G. (2015). Effect of uterine lavage on neutrophil counts in postpartum dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 158, 25-30.

Djuricic, D., Vince, S., Ablondi, M., Dobranic, T., Samardzija, M. (2012). Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. *Animal Reproduction Science*, 134, 119-124.

Driscoll, K. E., Schlesinger, R. B. (1988). Alveolar macrophage-stimulated neutrophil and monocyte migration: effects of in vitro ozone exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 93(2), 312-318.

Driscoll, K. E., Simpson, L., Carter, J., Hassenbein, D., Leikauf, G. D. (1993). Ozone inhalation stimulates expression of a neutrophil chemotactic protein, macrophage inflammatory protein 2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 119(2), 306-309.

Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J. (2010). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5225-5233.

Duricic, D., Valpotic, H., & Samardzija, M. (2015). Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Animal Reproduction Science*, 159, 1-7.

Durrani, A. Z., Raza, M. U., Channa, A. A. (2017). An Alternative Therapy with Ozone to Avoid Antimicrobial Resistance (AMR) in Uterine Infections in Dairy Cattle. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1(3), 778-784.

Foley, C., Chapwanya, A., Callanan, J. J., Whiston, R., Miranda-CasoLuengo, R., Lu, J., Meijer W. G., Lynn D.J., O'Farrelly, C., Meade, K. G. (2015). Integrated analysis of the local and systemic changes preceding the development of post-partum cytological endometritis. *BMC Genomics*, 16(1), 811.

Fouz, R., Yus, E., Sanjuán, M. L., Diéguez, F. J.(2014). Causas de eliminación en rebaños bovinos lecheros de raza frisona en Control Lechero Oficial. *ITEA* , 110, 171-86.

Gallart, M. T. (2018). Interleuquinas y su papel en las respuestas inmunes. Trabajos de investigación presentados en el LI Congreso Mexicano de Anestesiología: Mérida, Yucatán 2017. México. *Anestesia en México*, 30(2), 45-172.

García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J. A., Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*, 24 (2).

Ghasemi, F., Gonzalez-Cano, P., Griebel, P. J., Palmer, C. (2012). Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology*, 78(7), 1538-1547.

Gilbert R. O., Shin S. T., Guard, C. L., Erb, H. N., Frajblat M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 64: 1879-.

Góngora, A., Hernández, A. (2007). El posparto en la vaca. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 54(I), 25-42.

Healy, L. L., Cronin, J. G., Sheldon, I. M. (2014). Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Scientific Reports*, 4(1), 1-9.

Herath, S., Dobson, H., Bryant, C. E., Sheldon, I. M. (2006). Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *Journal of Reproductive Immunology*, 69(1), 13-22.

Herath, S., Dobson, H., Bryant, C. E., Sheldon, I. M. (2009). Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrin*, 7: 1-13.

Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Yoshino O, Ito M, Hasegawa A. (2008). Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology*, 149(3):1260–7.

Kim, I. H., Kang, H. G., Jeong, J. K., Hur, T. Y., Jung, Y. H. (2014). Inflammatory cytokine concentrations in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Theriogenology*, 82(3), 427-432.

Islam, R., Kumar, H., Nandi, S., Rai, R. B. (2013). Determination of anti-inflammatory cytokine in periparturient cows for prediction of postpartum reproductive diseases. *Theriogenology*, 79(6), 974-979.

Jenkin, G., Young, I. R. (2004). Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Animal Reproduction Science*, 82, 567-581.

Karstrup, C. C., Klitgaard, K., Jensen, T. K., Agerholm, J. S., Pedersen, H. G. (2017). Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology*, 99, 41-47.

Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., Johnson, W. H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62(1-2), 9-23.

Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., Johnson, W. H. (2005). A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *The Canadian Veterinary Journal*, 46(3), 255.

Kimura, K., Goff, J. P., Canning, P., Wang, C., Roth, J. A. (2014). . Effect of recombinant bovine granulocyte colony-stimulating factor covalently bound to polyethylene glycol injection on neutrophil number and function in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 4842-4851.

Larini, A., Bocci, V. (2005). Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology in Vitro*, 19(1), 55-61.

LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S., Johnson, W. H. (2002). Defining and diagnosing postpartum clinical

endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2223-2236.

LeBlanc, S. J., (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *The Veterinary Journal*, 176(1), 102-114.

Lee, J. I., Kim, I. H. (2007). Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *Journal of Veterinary Science*, 8(3), 283-288.

Lhermie, G., Tauer, L. W., Gröhn, Y. T. (2018). The farm cost of decreasing antimicrobial use in dairy production. *PLoS One*, 13(3).

Li, Q., Verma, I. M. (2002). NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 725-734.

Mahnani, A., Sadeghi-Sefidmazgi, A., Cabrera, V. E. (2015). Consequences and economics of metritis in Iranian Holstein dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6048-6057.

Maldonado, H., Narváez, J., Enríquez, M., Ortuño, C. (2017). Uso de la ozonoterapia para el control de la endometritis subclínica postparto en vacas lecheras. *Maskana*, 8, 105-108.

Martínez, A. F., Prado, E. A. S., López, O. F (2006). Las infecciones uterinas en la hembra bovina-Uterine infections in bovine female. *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(10), 1-38.

McDougall, S., Macaulay, R., Compton, C. (2007). Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 99(1-2), 9-23.

Medellín, A. M. (2011). El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 54(1), 18-27.

Megahed, A., Aldridge, B., Lowe, J. (2018). The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. *PloS One*, 13(5).

Miller, L. A., Royer, C. M., Pinkerton, K. E., Schelegle, E. S. (2017). Nonhuman primate models of respiratory disease: past, present, and future. *ILAR Journal*, 58(2), 269-280.

O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. HM Government and Wellcome Trust: UK.

Ogata, A., Nagahata, H. (2000). Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(7), 681-686.

Orrego, J., Delgado, A., Echevarría, L. (2013). Vida productiva y principales causas de descarte de vacas Holstein en la cuenca de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 14(1), 68-73.

Overton, M. W., Sischo, W. M., Reynolds, J. P. (2003). Evaluation of effect of estradiol cypionate administered prophylactically to postparturient dairy cows at high risk for metritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(6), 846-851.

Overton, M. W. (2008). Periparturient management for postparturient success. In: North American. Periparturient management Proceedings of the North American Veterinary Conference, Volume 22, Orlando, Florida, USA, 2008. The North American Veterinary Conference.

Paisley, L. G., Mickelsen, W. O. D., & Anderson, P. B. (1986). Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. *Theriogenology*, 25(3), 353-381.

Palmer, C. (2007). Metritis postparto en vacas lecheras. *Taurus*, 9(36), 20-37.

Perez, M. M. (1996). Interacción inmunoendocrina en el útero: papel de las hormonas esteroides sexuales. *Ciencia Veterinaria* (Vol. 7). Retrieved from UNAM.

Pérez-Trallero, E., Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(9), 520-529.

Peter, S., Michel, G., Hahn, A., Ibrahim, M., Lubke-Becker, A., Jung, M., Einspanier, R., Gabler, C. (2015). Puerperal influence of bovine uterine health status on the mRNA expression of pro-inflammatory factors. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66, 3, 449-462.

Potter, T. J., Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, P. J., Sheldon, I. M. (2010). Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*, 74(1), 127-134.

Pressman, S., Warburg, O. H. (2000). The story of ozone. *Plasmafire*.

Prunner, I., Pothmann, H., Wagener, K., Giuliadori, M., Huber, J., Ehling-Schulz, M., Drillich, M. (2014). Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 82(9), 1316-1322.

Purohit, G. N., Barolia, Y., Shekhar, C., Kumar, P. (2011). Maternal dystocia in cows and buffaloes: a review. *Open Journal of Animal Sciences*, 1(02), 41.

Ribeiro, E. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Bisinotto, R. S., Monteiro, A. P. A., Favoreto, M., Aries, H., Santos, J. E. P. (2013). Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *Journal of Dairy Science*, 6(9), 5682-5697.

Risco, C. A., Hernandez, J. (2003). Comparison of ceftiofur hydrochloride and estradiol cypionate for metritis prevention and reproductive performance in dairy cows affected with retained fetal membranes. *Theriogenology*, 60(1), 47-58.

San-Miguel, A., Martin-Gil, F. J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3), 106-113.

Santos, T. M., Bicalho, R. C. (2012). Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PloS One*, 7 (12).

Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Pfeiffer, D. U., Dobson, H. (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 123(6), 837-845.

Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S., Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8), 1516-1530.

Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N., Nash, D. M., Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, 76(1), 115-121.

Sheldon, M., Croning, J., Goetze, L., Danofrito, G., Schubert, H. (2009). Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. *Biology of Reproduction*, 81, 1025–1032.

Sheldon, M., Croning, J., Borges, A. (2011^a). The postpartum period and modern dairy cow fertility Part 1: Uterine function. *Livestock*, 16(4), 14-18.

Sheldon, M., Croning, J., Borges, A. (2011^b). The postpartum period and dairy cow fertility Part 2: Ovarian function. *Livestock*, 16(5), 20-24.

Sordillo, L. M., Raphael, W. (2013). Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 29(2), 267-278.

Stephen, C. P., Johnson, W. H., Leblanc, S. J., Foster, R. A., Chenier, T. S. (2019). The impact of ecobolic therapy in the early postpartum period on uterine

involution and reproductive health in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 18-0617.

Subandrio, A. L., Noakes, D. E. (1997). Neutrophil migration into the uterine lumen of the cow: the influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones using two intrauterine chemoattractants. *Theriogenology*, 47(4), 825-835.

Tapia, A. S., Martínez-Sánchez, G. (2012). La ozonoterapia y su fundamentación científica. *Revista Española de Ozonoterapia*, 2(1), 163-198.

Travagli, V., Zanardi, I., Bocci, V. (2009). Topical applications of ozone and ozonated oils as anti-infective agents: an insight into the patent claims. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery*, 4(2), 130-142.

Villanueva, G., Morales, S. (2017). Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 18(12), 1-12.

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

Wei, A., Feng, H., Jia, X. M., Tang, H., Liao, Y. Y., Li, B. R. (2018). Ozone therapy ameliorates inflammation and endometrial injury in rats with pelvic inflammatory disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 1418-1425.

Wicher, S. A., Jacoby, D. B., Fryer, A. D. (2017). Newly divided eosinophils limit ozone-induced airway hyperreactivity in nonsensitized guinea pigs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 312(6), L969-L982.

Wichmann, F., Udikovic-Kolic, N., Andrew, S., Handelsman, J. (2014). Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *MBio*, 5(2), e01017-13.

Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C., Noakes, D. E., Dobson, H., Sheldon, I. M. (2005). Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U.,

England, G. C., Noakes, D. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 3(1), 102-117.

Yellon, S. M. (2019). Immunobiology of cervix ripening. *Frontiers in Immunology*, 10.

Youngquist, R. S., Threlfall, W. R. (2006). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology-E-Book*. Missouri: Elsevier Health Sciences.

Zobel, R., Tkalčić, S., Štoković, I., Pipal, I., Buić, V. (2012). Efficacy of ozone as a novel treatment option for urovagina in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 293-298.

Zobel, R., Tkalčić, S. (2013). Efficacy of ozone and other treatment modalities for retained placenta in dairy cows. *Reproduction in domestic animals*, 48(1), 121-125.

Zobel, R., Martinec, R., Ivanovic, D., Rosic, N., Stancic, Z., Zerjavic, I., Flajsig, B., Plavec, H., Smolec, O. (2014). Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle. *Veterinarski Archive*, 84(1), 1-8.

ANEXOS

Anexo A Técnica de Cytobrush

Recomendaciones generales

- Para llevar a cabo la citología endometrial existe como prerrequisito que la persona que va a colectar la muestra domine la técnica de inseminación artificial.
- Se deben maximizar los cuidados de asepsia para evitar contaminar el útero, recomendamos lavar con agua simple el área peri-vulvar y utilizar siempre guantes de látex y camisa sanitaria.
- La técnica, aunque es poco invasiva, pudiera incomodar a algunas vacas (no es necesario aplicar anestesia epidural). Para llevarla a cabo, los animales deberán estar siempre sujetos de forma correcta de tal manera que le permita al operador trabajar de forma segura.
- Durante el desarrollo del presente manual realizamos varias pruebas que nos permitieron determinar que no es necesario que los animales se encuentren en alguna etapa del ciclo estral para poder llevar a cabo la técnica (aunque es más sencillo durante el éstro). También, en la literatura se ha reportado que no hay diferencias a lo largo del ciclo estral en cuanto a la proporción de neutrófilos polimorfonucleares (su conteo nos permite diagnosticar la endometritis subclínica). Por lo tanto, no es necesario sincronizar a los animales con productos hormonales para tomar una muestra válida.
- Se recomienda utilizar guantes en todo momento, tanto durante la toma de muestra y como durante el procesamiento, para evitar la contaminación.
- Para llevar a cabo el procesamiento de la muestra (fijación y tinción si es que esta última se realiza inmediatamente), se recomienda que sea realizado por una persona diferente a quien realiza la recolección de la muestra, para evitar la contaminación.
- Para realizar el procesamiento de la muestra se utilizó una tinción rápida de marca Hycel[®], pero puede ser sustituida por alguna tinción rápida de tres pasos, obteniendo los mismos resultados.

Material

Las herramientas requeridas para realizar la técnica son adaptaciones de material de uso humano y material de uso cotidiano en el establo, las modificaciones para el equipo de inseminación se realizaron en un taller de tornos especializado (CARIM Automatización, Diseño y Tecnología SA de CV, tel. 442-271-27-90).

Material para toma de muestra:

- Aplicador para inseminación artificial universal (modificado)
- Cepillos para citología vaginal de uso en humanos marca DL® (modificados)
- Fundas para inseminación
- Camisas sanitarias
- Guantes de látex
- Guantes de palpación

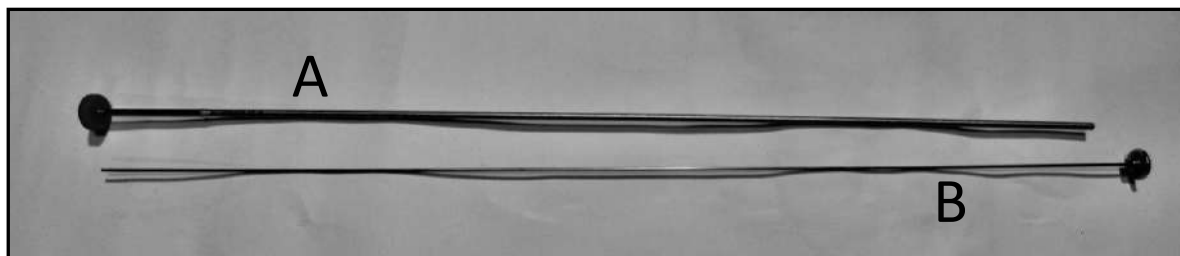
Material para análisis citológico:

- Porta objetos
- Tinción rápida de 3 pasos (Hycel®)
- Tijeras
- Microscopio óptico.

Modificaciones del equipo

- **Aplicador**

El aplicador cuenta con dos partes denominadas A y B, para su mejor entendimiento; La pieza B debe mandarse a roscar en su externo final, de manera que el mango del cepillo citológico enrosque en este extremo (la modificación de la pieza B se realiza en un taller de tornos).



Aplicador para inseminación artificial



Rosca en extremo final

- **Cepillos**

Los cepillos citológicos son cortados a 10 cm del inicio del cepillo; al mango se le introduce una broca de 1/16", para hacer más grande el hueco interno del mango. En este hueco enroscará la pieza B modificada.



Corte a 10 cm del inicio del cepillo



Introducir broca para hacer más grande el hueco

Armado

Para armar el equipo es importante utilizar guantes para evitar la contaminación de la muestra.

1. Sin sacar el cepillo citológico de su envoltura y con el aplicador de semen armado, se inserta la pieza B en el mango del cepillo y se rota en dirección de las manecillas del reloj, de manera que la pieza B entre en el mango del cepillo, por lo menos 0.5 cm.



Colocación de cepillo en el aplicador

2. Se introduce el mango del cepillo dentro de la pieza A justo hasta donde inician las cerdas del cepillo.



Introducir el mango del cepillo en el aplicador

3. Se coloca la funda para inseminación dejando el cepillo visible en el extremo.



Colocación de funda

4. Se coloca la camisa sanitaria



Colocación de camisa sanitaria

Toma de muestra

Para la toma de muestra es necesario utilizar guantes de palpación.

1. Se introduce la mano en el recto de la vaca y se identifica el cérvix.



Introducir la mano en el recto

2. Se introduce el aplicador de semen en la vagina de la vaca utilizando la técnica de inseminación artificial.



Insertar el aplicador

3. Se introduce el aplicador a través del cérvix
4. Una vez dentro del útero se expone el cepillo empujando 2 cm la pieza B y se asegura que éste entre en contacto con el cuerpo del útero.
5. Se rota la pieza B de manera gentil en dirección a las manecillas del reloj dando 3 vueltas.
6. Se retrae 2 cm la pieza B
7. Se retira el aplicador procurando no contaminarlo



Toma de muestra

Procesamiento de muestra

Para el procesamiento de la muestra deben utilizarse guantes limpios y preferentemente que lo haga una persona distinta a la que tomó la muestra para evitar contaminación.

1. Se retira la camisa sanitaria



Retirar la camisa sanitaria

2. Se corta la punta de la funda de inseminación



Corte de funda

3. Se expone el cepillo



Exponer el cepillo

4. En el portaobjetos se rota el cepillo en dirección de las manecillas del reloj, ejerciendo una ligera presión, de modo que se adhiera la mayor cantidad de muestra en el portaobjetos.



Rodamiento de cepillo

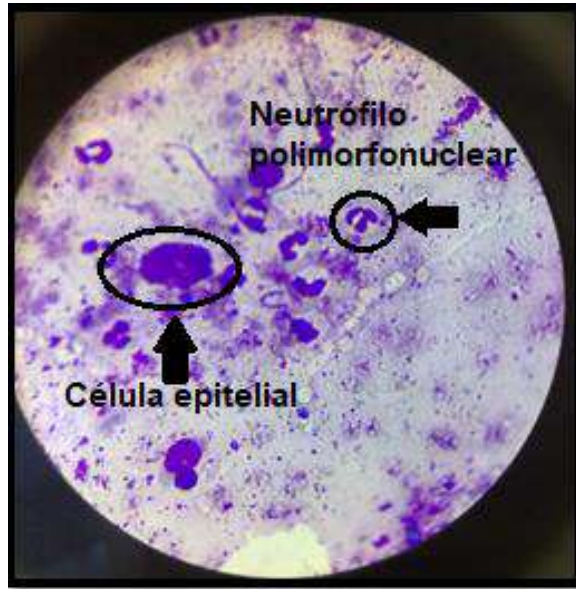
5. Se fija y se tiñe la muestra de acuerdo a las instrucciones del fabricante de la tinción Hycel®.



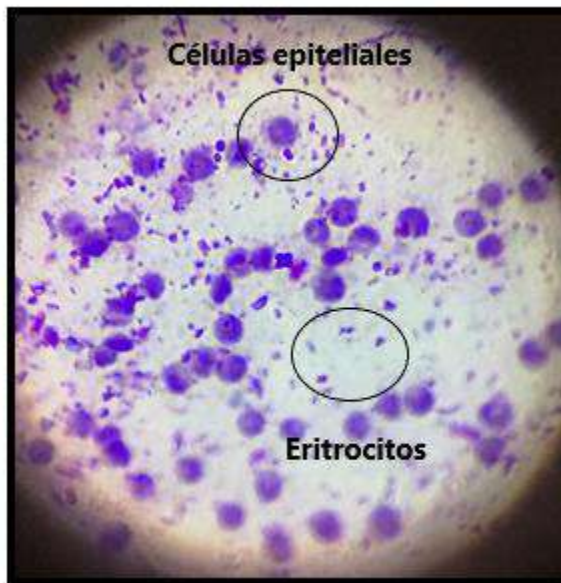
Tinción de muestra

Análisis de la muestra

1. En el microscopio óptico se enfoca la muestra con un objetivo 400x.
2. Se cuentan 200 células incluyendo células epiteliales y neutrófilos polimorfonucleares (NPMN).
3. Se obtiene el porcentaje de NPMN.
4. De acuerdo con este porcentaje y dependiendo de los días postparto a los cuales se tomó la muestra se determina si la vaca cursa o no por un proceso de endometritis subclínica.



Muestra con endometritis subclínica vista al microscopio



Muestra sin endometritis subclínica

Endometritis subclínica		
Días postparto	21-33	35-45
NPMN	≥18%	≥6%
	(Sheldon et al. 2009)	(Barajas et al. 2018)

Diagnóstico de endometritis subclínica

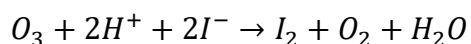
Referencias

- Barajas Merchan, J. L., Hernández Cerón, J., García Alfonso, A., Martínez Bárcenas, E., Juárez López, N. O., Bedolla Alva, M. A., & Luzbel de la Sota, R. (2018). Endometritis subclínica y tasa de gestación en vacas lecheras en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 9(1), 135-146.
- Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L., & Palmer, C. W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, 69(6), 714-723.
- Bogado Pascottini, O., & Opsomer, G. (2017). Diagnostico y tratamiento de las enfermedades del postparto uterino en vacas lecheras: una revision con énfasis en la endometritis subclinica= Diagnosis and treatment of pôstpartum uterine diseases in dairy cows: a review with emphasis on subclinical endometritis. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 7(1), 29-40.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., & Johnson, W. H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62(1-2), 9-23.
- Molina-Coto, R., & Lucy, M. C. (2018). Uterine inflammation affects the reproductive performance of dairy cows: A review. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 449-468.
- Reátegui, J., Arenas, E., Fernández, F., Rinaudo, A., Cuadros, S., & Marini, P. R. (2015). Punto de corte de polimorfos nucleares neutrófilos para diagnóstico de endometritis subclínica por citología endometrial en vacas lecheras. *sistemas intensivos de producción de leche, Arequipa. SPERMOVA*, 5(1), 79-82.
- Sheldon, I. M., Cronin, J., & Borges, A. (2011). The postpartum period and modern dairy cow fertility Part 1: Uterine function. *UK Vet Livestock*, 16(4), 14-18.

Anexo B Protocolo para determinación de ozono residual en solución salina

Principio

El ozono reacciona con yoduro de potasio (KI) para producir yodo (I₂) y agua. Para resultados más precisos se debe hacer alcalina la solución de KI durante la absorción de ozono. En la práctica, las soluciones de KI rápidamente se vuelven alcalinas durante el proceso, por lo que no se requiere de buffer. Después de acidificar inmediatamente, el yodo liberado se titula con tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃), con almidón como indicador.



La estabilidad de las soluciones con ozono disminuye progresivamente con el incremento de la temperatura arriba del congelamiento y con el incremento del pH arriba de 3.0.

Muestras y almacenaje

Determinar el ozono inmediatamente; las muestras no pueden ser preservadas o almacenadas por la inestabilidad del ozono residual. La estabilidad del ozono residual se mejora marcadamente con bajas temperaturas y bajo pH. Minimizar la aeración durante la toma de muestra.

Equipo

Equipo ozonificador de grado médico (Oxyzonic System Medic, EDE Ozone)

Oscilador

Materiales

- 1 frasco lavador de gases
- 1 pinzas para bureta
- 1 bureta de 25 ml
- 1 soporte universal
- 2 matraces aforados de 1 L
- 4 matraces Erlenmeyer de 250 ml
- 1 vaso de precipitados de 50 ml
- 1 probeta de 50 ml
- 1 probeta de 250 ml
- 1 frasco con tapa de 250 ml

Reactivos

- Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.0005 N, marca Fermont (catalogo:72912)
- Yoduro de potasio (KI) 1g/ml, marca Karal (catalogo: 5090)
- Almidón, marca Golden Bell (catalogo: 36920)
- Ácido sulfúrico concentrado, marca Karal (catalogo: 1030)

Procedimiento

Preparación de soluciones

Preparación de solución de tiosulfato (anhidro).

Primero realizar una solución 0.05 N, y luego diluir 1:100.

$$\text{Normalidad} \times L \times \frac{PM}{\text{carga}} = g$$

$$0.05 \text{ N} \times 1 \text{ L} \times \frac{158 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{2} = g$$

3.95 = g de tiosulfato de sodio anhidro

Pesar 3.95 g de tiosulfato de sodio anhidro y disolver en 900 ml de agua destilada en matraz aforado de 1 L. Aforar con agua destilada. Mezclar bien.

Diluir de la siguiente manera para lograr una concentración 0.0005 N: tomar 10 ml de la solución 0.05 N y aforar con agua destilada a 1 L en otro matraz aforado.

Solución de KI

Disolver un gramo de yoduro de potasio en un mililitro de solución salina. Cuidar que no se contamine.

Procedimiento

Colocar en cada matraz Erlenmeyer 0.6 ml de solución de KI.



Colocar 150 ml de solución salina en el lavador de gases. Ozonificar por el tiempo deseado.

Medir 30 ml de solución ozonificada y depositar en matraz con KI, tapar inmediatamente.



Llevar muestra al oscilador por 3 minutos



La solución ozonificada restante se debe colocar en el frasco con tapa de 250 ml. Se debe cerrar bien frasco entre cada toma de muestra.

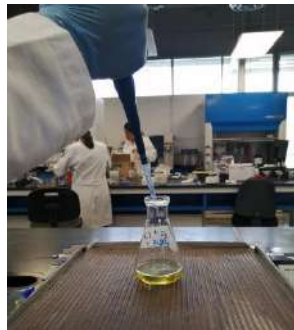


A los 5 minutos tomar la siguiente muestra de 30 ml de solución ozonificada, depositar en matraz Erlenmeyer con solución de KI, tapar y dejar en agitación suave por 3 min en el oscilador.

A los 15 minutos tomar la siguiente muestra de 30 ml de solución ozonificada, depositar en matraz Erlenmeyer con solución de KI, tapar y dejar en agitación suave por 3 min en el oscilador.

A los 20 minutos tomar la siguiente muestra de 30 ml de solución ozonificada, depositar en matraz Erlenmeyer con solución de KI, tapar y dejar en agitación suave por 3 min en el oscilador.

Agregar a la muestra 39.8 microlitros de ácido sulfúrico concentrado. Titular hasta que bajar la tonalidad de color amarillo con tiosulfato de sodio 0.0005 N.



Agregar 0.6 ml de almidón.



La solución se tornará azul



Continuar titulando hasta que la solución sea trasparente



El procedimiento se realiza por triplicado

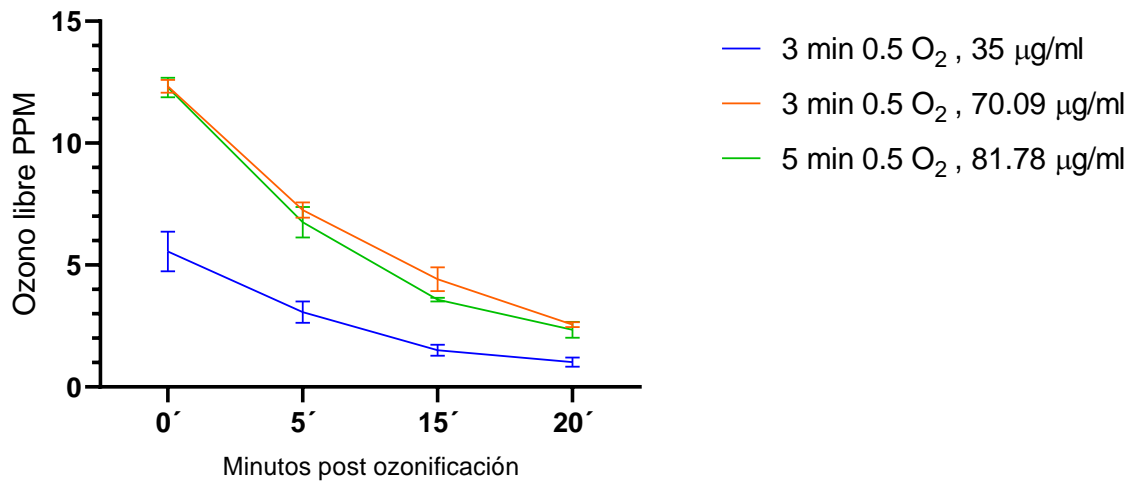


Para determinar las partes por millón de O_3 se aplica la siguiente formula:

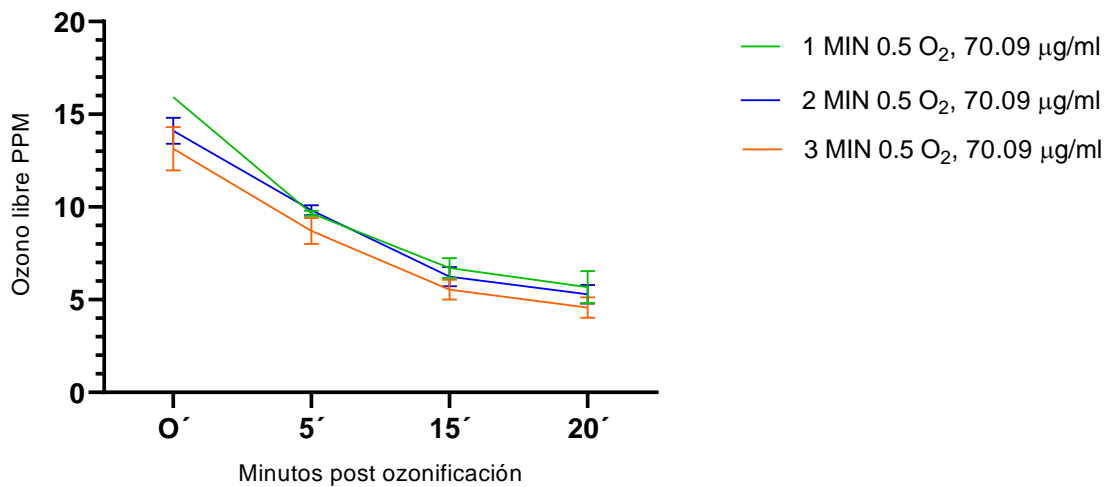
$$0.4(\text{ml de tiosulfato de sodio } 0.0005 \text{ N gastados para la titulación}) = \text{PPMO}_3$$

Disociación del ozono en SSF

Curva de ozonificación con diferentes grados de concentración de flujo de ozono.



Curva de concentración de ozono en tiempo



Referencias

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, & Water Environment Federation. (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association.