



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**THAMIRYS DIAS DE LUNA PAIVA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA COM OZÔNIO  
INTRARETAL SOBRE OS PERFIS HEMATOLÓGICOS,  
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM EQUINOS**

**ILHÉUS-BA  
2024**

**THAMIRYS DIAS DE LUNA PAIVA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA COM OZÔNIO  
INTRARETAL SOBRE OS PERFIS HEMATOLÓGICOS,  
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM EQUINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.  
Linha de Pesquisa: Produção e Comportamento Animal/ Bem-estar Animal. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho. Coorientadora: Profa. Dra. Maria Amélia Fernandes Figueiredo.

**ILHÉUS-BA**

**2024**

**THAMIRYS DIAS DE LUNA PAIVA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA COM OZÔNIO INTRARETAL SOBRE OS  
PERFIS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM  
EQUINOS**

Ilhéus-Bahia, 26/02/2024.

Sérgio Luiz Gama Nogueira Filho - Doutor  
Universidade Estadual de Santa Cruz  
Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais  
(Orientador)

Maria Amélia Fernandes Figueiredo - Doutora  
Universidade Estadual de Santa Cruz  
Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais  
(Coorientadora)

Denise Pereira Leme -Doutora  
Universidade Federal De Santa Catarina  
Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Rural

Gustavo Ferrer Carneiro - Doutor  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Departamento de Medicina Veterinária

**ILHÉUS-BA**

**2024**

Às minhas filhas e esposo, aos meus pais e familiares. Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus minha fonte de vida e de força, as minhas filhas Alice e Beatriz por serem meus combustíveis, ao meu marido Levy pela paciência, a meus sogros queridos pelo apoio, aos meus pais pelas orações, a família Conrado por ceder seus animais e espaço, ao meu orientador por tantos ensinamentos, a minha coorientadora pela parceria, a CAPES pela concessão da bolsa, aos meus amigos que me acompanharam nessa jornada, em especial a Álvaro, Gabriela, José, Jamille, Inês e Anna. Aos animais que por mim passaram. A todos, obrigada!

*“Posso todas as coisas naquele que me fortalece”*

*Filipenses 4.13*

## AValiação DO EFEITO DA TERAPIA COM OZÔNIO INTRARETAL SOBRE OS PERFIS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM EQUINOS

### RESUMO

Cavalos usados em competições estão sujeitos a lesões musculares e podem se beneficiar dos efeitos anti-inflamatórios do ozônio medicinal. Portanto, objetivou-se aqui avaliar o efeito da ozonioterapia sobre o perfil hematológico e bioquímico, na morfologia das hemácias, bem como possíveis desconfortos ou dor induzidos pelo procedimento em cavalos de esporte. Para este fim, foram usados 12 equinos da raça Quarto de Milha, três machos e nove fêmeas, com idade entre 4 e 12 anos, um mês depois do fim da temporada de competições. Foram coletadas amostras de sangue antes do tratamento (Controle), 24 horas depois do fim da administração da ozonioterapia (24-h após ozonioterapia) e sete dias depois do último dia de administração da ozonioterapia (7-dias após ozonioterapia). Foram usados a concentração de  $30\mu\text{g O}_3/\text{mL}$ , a dose de  $60\mu\text{g O}_3/\text{kg}$  e o fluxo de  $125\text{mL}/\text{min}$ . O tempo da sonda no reto do animal variou de 5 a 8 minutos de acordo com o peso. Também foi feita a avaliação da dor por meio de variações na expressão facial antes e durante a aplicação da ozonioterapia, além de avaliação clínica e determinação da frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) antes e imediatamente depois do procedimento. Houve efeito do tratamento nas concentrações de hemoglobina ( $P=0,012$ ) e hemoglobina corpuscular média (CHCM) ( $P<0,001$ ), como também na atividade sérica da aspartato amino transferase (AST) ( $P<0,001$ ). Os testes *post hoc* mostraram que houve redução na concentração de hemoglobina nas amostras sanguíneas coletadas 24-h após ozonioterapia em comparação com as demais ( $P<0,05$ ). Houve aumento na concentração de CHCM nas amostras coletadas 7-dias após ozonioterapia em comparação com as demais ( $P<0,05$ ). Houve redução na atividade sérica da AST nas amostras coletadas 7-dias após ozonioterapia em comparação com as demais ( $P<0,05$ ). Adicionalmente, esfregaços das amostras sanguíneas 24-h após ozonioterapia apresentaram hemácias com deformidade da membrana. Amostras coletadas 7-dias após ozonioterapia não apresentaram alterações na morfologia das hemácias. Nenhum animal, contudo, apresentou manifestação clínica durante todo experimento. Houve, entretanto, aumento na pontuação da dor (antes:  $4,2 \pm 0,4$ , durante:  $5,3 \pm 0,4$ ;  $F_{1, 107} = 5,20$ ;  $P = 0,025$ ). Isso indica a necessidade de sedação para a administração do ozônio via intrarectal. A redução na concentração de hemoglobina era esperada porque o dano oxidativo leva a desnaturação dessa proteína o que gera uma hipóxia transitória e isso estimula a medula óssea a produzir novos eritrócitos que são mais ricos em enzimas antioxidantes e com maior concentração de hemoglobina sendo, portanto, células mais reativas com oxigênio (CHCM), melhorando a perfusão tecidual. A AST diminuída 7-dias após ozonioterapia, reforça que não houve dano hepático, um dos possíveis efeitos colaterais da ozonioterapia. Conclui-se que aplicação do ozônio insuflado via intrarectal apresentou efeitos positivos para recuperação de cavalos de esporte o que precisa ser confirmado em testes de desempenho.

**Palavras-chave:** cavalos de esporte; estresse oxidativo; hemácias; ozonioterapia.

## EVALUATION OF THE EFFECT OF INTRARECTAL OZONE THERAPY ON HEMATOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND BEHAVIORAL PROFILES IN HORSES

### ABSTRACT

Horses used in competitions are prone to muscle injuries and could benefit from the anti-inflammatory effects of medical ozone. Therefore, the aim in this study was to evaluate the effect of ozone therapy on the hematological and biochemical profile, on red blood cell morphology, as well as possible discomfort or pain induced by the procedure in athletic horses. To this end, 12 Quarter Horses were used, three males and nine females, aged between 4 and 12 years old, one month after the end of the competition season. Blood samples were taken before treatment (Control), 24 hours after the end of ozone therapy administration (24-h after ozone therapy) and seven days after the last day of ozone therapy administration (7-days after ozone therapy). A concentration of 30 $\mu$ g O<sub>3</sub>/mL, a dose of 60 $\mu$ g O<sub>3</sub>/kg and a flow of 125mL/min were used. Pain was also assessed through variations in facial expression before and during the application of ozone therapy, as well as clinical assessment and determination of heart rate (HR) and respiratory rate (RR) before and immediately after the procedure. There was a treatment effect on hemoglobin (P=0.012) and mean corpuscular hemoglobin (MCHC) concentrations (P<0.001), as well as on serum aspartate amino transferase (AST) activity (P<0.001). The post hoc tests showed that there was a reduction in hemoglobin concentration in the blood samples collected 24-hours after ozone therapy compared to the others (P<0.050). There was an increase in the concentration of MCHC in the samples collected 7-days after ozone therapy compared to the others (P<0.05). There was a reduction in serum AST activity in the samples collected 7-days after ozone therapy compared to the others (P<0.050). In addition, smears of the blood samples taken 24-hours after ozone therapy showed red blood cells with membrane deformity. Samples taken 7-days after ozone therapy showed no changes in the morphology of the red blood cells. However, no animal showed any clinical manifestations throughout the experiment. There was an increase in the pain score ((P=0.025). This indicates the need for sedation for intrarectal ozone administration. The reduction in hemoglobin concentration was expected because oxidative damage leads to the denaturation of this protein which generates transient hypoxia and this stimulates the bone marrow to produce new erythrocytes which are richer in antioxidant enzymes and have a higher concentration of hemoglobin and are therefore more reactive cells with oxygen (CHCM), improving tissue perfusion. The lower AST 7-days after ozone therapy reinforces that there was no liver damage, one of the possible side effects of ozone therapy. It can be concluded that the application of intrarectal ozone had positive effects on the recovery of sport horses, which needs to be confirmed in performance tests.

**Keywords:** oxidative stress; ozone therapy; red blood cells; sport horses.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Médias ( $\pm$  EP) de hemoglobina (g/dL) de acordo com a fase experimental.....27
- Figura 2-** Médias ( $\pm$  EP) de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%) de acordo com fase experimental.....27
- Figura 3-** Médias ( $\pm$  EP) de aspartato amino transferase (AST) (UI/L) de acordo com fase experimental.....28
- Figura 4 –** Imagens das hemácias nos esfregaços sanguíneos (ampliação 100x) nas fases experimentais: Controle - três dias antes da ozonioterapia (a); 24 h depois da administração do ozônio (b) as setas na figura destacam algumas das membranas celulares danificadas; 7 dias depois do último dia da ozonioterapia (c).....30

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Características dos animais e duração de aplicação da ozonioterapia.....23
- Tabela 2-** Efeito da fase experimental (Controle, 24h após a ozonioterapia e 7-dias após a ozonioterapia) sobre as médias (EP: erro padrão) dos parâmetros do hemograma e bioquímicos de equinos (N = 12) submetidos a ozonioterapia intraretal.....29

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVO GERAL.....	13
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
4 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
4.1 Ozônio e ozonioterapia.....	14
4.2 Hemograma .....	15
4.3 Perfil Bioquímico .....	16
4.4 Avaliação de dor em equinos.....	16
5. Artigo Científico.....	18
ABSTRACT .....	20
6 INTRODUÇÃO.....	21
7 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
7.1 Seleção dos animais, dose e concentração de ozônio.....	22
7.2 Coleta sanguínea e processamento das amostras.....	24
7.3 Gravação de imagens dos animais para avaliação da dor.....	25
7.4 Análise dos dados .....	26
8 RESULTADOS .....	27
9 DISCUSSÃO.....	32
10 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS .....	35
APÊNDICES .....	40
Apêndice 1: análises estatísticas dos dados de hemograma e bioquímicos.....	40
Apêndice 2: análises estatísticas dos dados comportamentais .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo o cavalo é utilizado em diversas atividades, desde esportes, uso agropecuário e trabalho, até o uso militar (MCBRIDE & MILLS, 2012). Em nosso país, a equideocultura movimentava mais de 16 bilhões de reais anuais e é responsável pela ocupação de três milhões de pessoas de forma direta (tratadores, veterinários e treinadores) ou indireta (por exemplo, em eventos equestres, como provas de enduro, vaquejada e três tambores) (MAPA, 2016).

Nas provas equestres, os cavalos são muito requisitados quanto ao seu condicionamento físico. Exercícios repetitivos induzem uma grande adaptação fisiológica e anatômica em cavalos, e a resposta adaptativa atua para reduzir o efeito da tensão induzida pelo estresse fisiológico associado ao exercício. Nesse processo, há mudanças nos constituintes sanguíneos que refletem nas vias metabólicas e no processo funcional da disciplina atlética. Dessa forma, é possível avaliar a eficiência do treinamento e garantir um *status* saudável ao cavalo atleta por meio da avaliação nas modificações dos parâmetros da bioquímica sérica (BALOGH *et al.*, 2001; KINGSTONN, 2004; PICCIONE *et al.*, 2007). Por exemplo, alterações em enzimas, tais como lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK), são comumente usadas para avaliar os efeitos do estresse muscular, especialmente na musculatura cardíaca (ASSENZA *et al.*, 2016; BOFFI *et al.*, 2016). Adicionalmente, a CK também reflete o dano secundário à fibra muscular causado pelo esforço repetitivo (ASSENZA *et al.*, 2016; BOFFI *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo, quando os níveis de antioxidantes não são altos o suficiente para compensar os efeitos nocivos dos radicais livres (KINNUNEM *et al.*, 2005; BOTTEGARO *et al.*, 2018), é uma das principais causas de danos às fibras musculares. Isso compromete o desempenho de cavalos submetidos a exercícios regulares intensos (BOTTEGARO *et al.*, 2018). Este tipo de estresse resulta em baixo desempenho e claudicação (KINNUNEM *et al.*, 2005; TSUZUKI *et al.*, 2015); assim, sua redução é essencial. A redução do estresse oxidativo pode ser alcançada por meio da prevenção na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são moléculas instáveis e extremamente reativas formadas durante o processo de redução de parte do oxigênio consumido pelo animal (SILVA; GONÇALVES, 2010). No entanto, a prevenção na produção de ROS é difícil em cavalos de esporte. É essencial, portanto, aumentar os níveis de antioxidantes (PO *et al.*, 2011). Por meio da mensuração do potencial

biológico antioxidante (BAP), estudos mostraram que a auto-hemoterapia ozonizada promove o aumento da produção de antioxidantes em cavalos puro-sangue (TSUZUKI *et al.*, 2015).

O fundamento do uso do ozônio é baseado na sua ação oxidante. Por ser uma molécula altamente reativa é capaz de inativar microrganismos, estimular o sistema imunológico e também induzir efeito analgésico (BOCCI, 2002; BHATT *et al.*, 2016; VENDRUSCOLO *et al.*, 2018; SCIORSCI, 2020). A ruptura inicial da homeostase provocada pela ação de oxidação do ozônio é seguida pelo seu rápido restabelecimento. Isso ocorre por meio de várias reações bioquímicas nas células sanguíneas mediadas por produtos da oxidação lipídica (LOP). Essas reações, por sua vez, promovem a indução de um processo adaptativo devido à regulação positiva das enzimas antioxidantes (BOCCI *et al.*, 2011). Adicionalmente, a ozonioterapia melhora a circulação sanguínea e o fornecimento de oxigênio aos tecidos (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2012) o que pode acelerar o processo de recuperação dos produtos gerados pelo estresse oxidativo em cavalos de esporte.

A ozonioterapia consiste na utilização do ozônio medicinal, formado por uma mistura de oxigênio (O<sub>2</sub>) e ozônio (O<sub>3</sub>). O O<sub>3</sub> em altas concentrações, contudo, é tóxico. Por esse motivo, recomenda-se a mistura contendo não menos que 95% de oxigênio e não mais que 5% de ozônio (BOCCI, 2006b). Porém, quando administrado em concentrações menores que 10µg/mL, o gás é prontamente neutralizado pelos antioxidantes sanguíneos, sendo biologicamente ineficiente por não atingir o limiar terapêutico (SAGAI; BOCCI, 2011a). Dessa forma, é necessário manter o O<sub>3</sub> dentro de uma “janela terapêutica” com concentrações variando de 10 a 80 µg/mL. Dentro desse intervalo, a ozonioterapia gera efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios, bactericidas, antivirais, antifúngicos, analgésicos, entre outros (SCHWARTZ; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, 2012).

O uso do O<sub>3</sub> foi regulamentado por meio da Resolução N°1364 de outubro de 2020 pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária. A ozonioterapia pode ser administrada por diversas vias, tais como a auto-hemoterapia, insuflações retais, vaginais ou endometriais, intra-articular (IA), óleos vegetais ozonizados aplicados por via tópica ou oral, auricular, intraperitoneal, subcutâneo, entre outras (BOCCI, 2006a; JANI *et al.*, 2012). Uma das formas de administração é a via intrarectal (IR) (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2012; JARAMILLO *et al.*, 2020). Na doença arterial coronariana em humano houve melhora no tempo de protrombina e diminuição dos biomarcadores de oxidação lipídica e proteica, gerando menor produção de radicais livres e melhora na detoxificação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após o uso de ozônio intrarectal (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2012). Estes resultados positivos indicam o potencial da aplicação da ozonioterapia via intrarectal para o tratamento de cavalos de esporte, além de ser menos invasiva e bem tolerada

pelos animais, como também apresentar custo relativamente mais baixo que as demais vias de administração do ozônio.

Sabe-se que sessões terapêuticas repetidas podem permitir que os compostos LOP atinjam a medula óssea e ativem um desenvolvimento sutil no nível eritropoiético, estimulando a formação de novos eritrócitos com características bioquímicas melhoradas, chamados de “eritrócitos superdotados” (BOCCI, 2004; BOCCI *et al.*, 2011). Isso pode promover a melhoria no condicionamento físico de cavalos de esporte, já que naturalmente nos eritrócitos estão presentes potentes enzimas antioxidantes (catalase, GSH-Rd, GSH-Px, GSH-Tr e SOD). Estas enzimas podem eliminar rapidamente grandes quantidades de oxidantes gerados durante o exercício físico aumentando a perfusão e oxigenação tecidual (BOCCI *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2017; SEYAM *et al.*, 2018).

Vários estudos comprovam a eficiência da ozonioterapia na medicina humana (CHANG *et al.*, 2005; CARDELLI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010; MAWSOUF *et al.*, 2011; CALUNGA *et al.*, 2012; CAMELIA *et al.*, 2014). Na Medicina Veterinária, porém, é um assunto ainda pouco estudado. Na literatura há apenas alguns estudos com equinos (ALVES *et al.*, 2004; BALLARDINI, 2005, 2006; HADDAD *et al.*, 2009ab; TSUZUKI *et al.*, 2015; VENDRUSCOLO *et al.*, 2018; JARAMILLO *et al.*, 2020) e bovinos (OGATA; NAGAHATA, 2000; ZOBEL *et al.*, 2012). Não foram encontrados, contudo, estudos que avaliaram o uso da ozonioterapia visando sua aplicação em cavalos de esporte. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ozonioterapia via intrarectal nos parâmetros hematológicos e bioquímicos além da percepção da dor causada pelo procedimento em cavalos de esporte em fase de recuperação pós-temporada de provas.

## **2 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar os efeitos do ozônio medicinal nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, na morfologia das hemácias, além de possíveis desconfortos ou dor induzidos pelo procedimento em cavalos de esporte.

## **3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito da terapia com ozônio via intrarectal sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos.
- Comparar a morfologia de células sanguíneas antes e depois da administração da ozonioterapia.
- Comparar a expressão de comportamentos indicadores de dor antes e durante a administração da ozonioterapia.
- Comparar a frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) antes e imediatamente depois da administração da ozonioterapia.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Ozônio e ozonioterapia

O ozônio tem sido usado desde a Segunda Guerra mundial, há relatos do seu uso como antisséptico e para melhorar a perfusão tecidual em feridas (JARAMILLO *et al.*, 2020). Atualmente, é considerado como terapia complementar e vem se difundido tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária e em outras áreas como odontologia (CASE *et al.*, 2012; BOCCI *et al.*, 2015; VENDRUSCOLO *et al.*, 2018). Esse gás é formado por três átomos de oxigênio e é instável a temperatura ambiente, tem alto poder oxidante e reage com qualquer substância e se transforma em oxigênio. Na natureza, é formado por meio de descargas elétricas, já para o uso medicinal o ozônio é formado por uma máquina geradora que transforma moléculas de oxigênio medicinal em ozônio também por meio de descargas elétricas. Neste mesmo aparelho, é possível dosar a concentração desse gás. Em geral, a ozonioterapia consiste numa mistura gasosa formada aproximadamente por 95% de oxigênio e 5% de ozônio que pode variar de acordo com a regulação do aparelho (BHATT *et al.*, 2016). Segundo Bocci (2004, 2011), para humanos existe uma janela terapêutica de concentração que precisa ser respeitada para que não haja efeito placebo nem o inverso, ou seja, efeito nocivo por dano oxidativo; para que isso não ocorra deve-se utilizar concentrações entre 10 e 80mcg/mL. Essa mesma janela é usada para equinos (ISCO3, 2020).

A ozonioterapia pode ser administrada por diversas vias como a auto-hemoterapia maior ou menor, intramuscular, tópica e insuflações auricular, vaginal e intrarectal (SMITH *et al.*, 2017). O ozônio ao entrar em contato com fluidos corporais, como o sangue por exemplo, reage imediatamente e produz espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são rapidamente neutralizadas por substâncias antioxidantes presentes no plasma como albumina, por exemplo. Além desses compostos, outras substâncias são formadas como os produtos da peroxidação lipídica (LOPS) essas permanecem por mais tempo no organismo e desencadeiam uma série de processos metabólicos intracelulares e promove uma miríade de atividades que estimulam diversos mecanismos celulares e os sistemas de defesa da célula são alertados, melhorando sua funcionalidade (BOCCI *et al.*, 2011; VIEBAHN-HANSLER *et al.*, 2012; BHATT *et al.*, 2016; GALIE *et al.*, 2018; SINISCALCO *et al.*, 2018).

A finalidade da ozonioterapia é promover um estresse oxidativo controlado e transitório para que os mecanismos antioxidantes sejam ativados. Desta forma, a depender da via e finalidade escolhida existem inúmeros benefícios que essa técnica pode trazer como por

exemplo o aumento da produção de antioxidantes, efeitos imunomodulatórios, e ativação da medula óssea (SMITH *et al.*, 2017; SCIORSCI *et al.*, 2020).

#### **4.2 Hemograma**

O hemograma é um exame que avalia o tecido sanguíneo a partir de amostras de sangue periférico, calculando-se o número de hemácias circulantes, concentração de hemoglobina (HB), volume globular (VG), índices volumétricos, como volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), linfócitos, leucócitos absolutos e relativos, exame morfológico microscópico. Para a interpretação adequada desse exame deve-se levar em consideração a concentração de proteínas plasmáticas (PPT) e fibrinogênio. As alterações hematológicas refletem a condição do indivíduo ou uma resposta global a uma situação patológica. Os resultados devem ser interpretados levando em consideração diferentes dados do paciente, como idade, raça, sexo, método de punção venosa, estação do ano, estado reprodutivo, alimentação, treinamento, exercício, entre outros que são informações fornecidas pelo exame clínico (SATUÉ; MUÑOZ; GARDÓN, 2013).

Diferentes de outros animais como os carnívoros, os equinos têm algumas particularidades como a ausência de células imaturas na circulação como, por exemplo, os reticulócitos. Isso significa que todo o processo de desenvolvimento e maturação das células ocorre na medula óssea. Por esse motivo, as características morfológicas relacionadas à regeneração, descritas em outras espécies, como policromasia ou reticulocitose, macrocitose ou outros sinais de regeneração periférica, raramente são encontradas em esfregaços de sangue de cavalo. Além disso, a interpretação correta dos valores hematológicos equinos depende se o animal é considerado uma das chamadas raças de “sangue quente” ou “sangue frio”. Os cavalos de “sangue quente” são aqueles de ascendência árabe, incluindo as raças Árabe, Quarto de Milha, *Appaloosa*, *Standardbred* e Puro Sangue Inglês. Por sua vez, os cavalos de “sangue frio” são basicamente animais do tipo tração, incluindo as raças: *Clydesdale*, *Percheron*, *Hack* e *Shire*. Em geral, animais das raças “sangue frio” têm limites de referência mais baixos para parâmetros de hemácias do que as de “sangue quente”. Situações de hipoxia geradas por patologias ou adaptação a grandes altitudes desencadeiam um processo fisiológico secundário a essas condições, o que leva ao aumento do número de eritrócitos que vai refletir no aumento do volume globular, número de hemácias e hemoglobina (SATUÉ; MUÑOZ; GARDÓN, 2013).



### **4.3 Perfil Bioquímico**

O aparelho muscular esquelético pode ser avaliado por constituintes séricos como as enzimas creatina fosfoquinase (CK), aspartato amino-transferase (AST), lactato-desidrogenase (LDH). Estas enzimas tendem a aumentar após exercício físico devido ao aumento da permeabilidade do sarcolema. Porém, valores acima da referência indicam lesões muscular esqueléticas e/ou cardíacas (CÂMARA E SILVA *et al.*, 2007; ASSENZA *et al.*, 2016). A CK é considerada um marcador confiável de lesão muscular esquelética. Esta enzima catalisa a fosforilação da adenosina difosfato (ADP) do fosfato de creatina, tornando a adenosina trifosfato (ATP) disponível para a contração muscular. A LDH catalisa a reação reversível de L-lactato para piruvato em todos os tecidos, está presente em grandes quantidades na musculatura esquelética e tem tempo de meia vida mais longa do que a CK. Deste modo, a LDH é usada para avaliar a recuperação dos animais pós-exercício. As atividades de AST podem aumentar imediatamente durante o exercício sem observação de sinais clínicos ou detecção histológica de alterações na estrutura das células musculares, ela também é utilizada para detectar danos no tecido hepático, pois o músculo e o fígado são as principais fontes dela no organismo (CÂMARA E SILVA *et al.*, 2007).

### **4.4 Avaliação de dor em equinos**

A avaliação da dor em equinos é parte crucial do cuidado veterinário, especialmente porque os cavalos muitas vezes não demonstram sinais óbvios de dor. Identificar e quantificar a dor em equinos pode ser desafiador, uma vez que esses animais têm tendência a mascarar sinais de desconforto por serem presas na natureza. Alguns indicadores podem ser considerados ao avaliar a dor em equinos como isolamento, letargia ou agressividade. Expressões faciais, usadas para identificar desconforto em escalas de dor estabelecidas para equinos, vem sendo amplamente testadas (TORCIVIA; MCDONNELL, 2021). São elas a *Horse Grimace Scale* (HGS) (DALLA COSTA *et al.*, 2014) e *Equine Pain Face* (EPF) (GLEERUP; LINDEGAARD, 2016).

Para ambas as escalas de dor os observadores usam um etograma, no qual é avaliada a posição das orelhas e o nível de tensão no olhar, narinas, e músculos da mastigação, para caracterizar o nível de dor/desconforto dos cavalos em uma escala que varia de 0 (zero) a 12 para a escala HGS e de 0 a 4 para a EPF. Os métodos basicamente diferenciam-se na forma da

coleta de informações. Para a escala HGS são usadas seis imagens congeladas (fotografias) provindas do vídeo original com gravação contínua para a aplicação dos escores de dor/desconforto. Enquanto para a EPF, os observadores aplicam os escores em videoclipes de 30 segundos cada, que também são selecionados a partir da gravação original. Caso a dor/desconforto provocado pelos procedimentos usados seja evidente o animal, provavelmente, permanece com a mesma expressão facial por alguns minutos seguidos e isso será registrado nas imagens congeladas ('fotografias'). Contudo, caso os animais apresentem variação nas suas expressões faciais de forma constante, as fotografias podem não representar de forma adequada o nível de dor causado pelos tratamentos testados. Por este motivo, os videoclipes podem se mostrar mais apropriados, apesar de requerem tempo maior para sua análise. Além das escalas de dor, alterações na frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) podem indicar dor ou estresse e também são usadas para essa finalidade (GLEERUP, 2016). Dessa forma, para a percepção mais ampla da dor em equinos, pode-se aplicar uma abordagem multimodal, combinando diferentes métodos.

## **5. Artigo Científico**

Para este artigo foram seguidas as normas do Periódico *Equine Veterinary Journal* ao qual o manuscrito será submetido

## Avaliação dos perfis hematológicos e bioquímicos e da dor em cavalos de esporte submetidos à ozonioterapia

### RESUMO

O ozônio medicinal é usado em diversos tratamentos devido a sua ação oxidante. Objetivou-se aqui avaliar o impacto do gás ozônio administrado por via intrarectal sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem como a dor induzida pelo procedimento em cavalos usados em esporte. Foram analisadas amostras sanguíneas de 12 equinos coletadas antes do tratamento (Controle), 24 horas após tratamento com ozônio (24-h após ozonioterapia) e sete dias após o término do último dia de ozonioterapia (7-dias após ozonioterapia). Foram usados a concentração de  $30\mu\text{g O}_3/\text{mL}$ , a dose de  $60\mu\text{g O}_3/\text{kg}$  com base em ISCO3 (2020) e o fluxo de  $125\text{mL}/\text{min}$ . O tempo da sonda no reto do animal variou de 5 a 8 minutos de acordo com o peso. Também foi feita avaliação da dor, avaliação clínica e determinação da frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) antes e após aplicação da ozonioterapia. Houve efeito da fase experimental nas concentrações de hemoglobina ( $F_{2,20}=5,55$ ;  $P=0,012$ ) e hemoglobina corpuscular média (CHCM) ( $F_{2,20}=16,01$ ;  $P<0,001$ ), como também na atividade sérica da aspartato amino transferase (AST) ( $F_{2,20}=20,49$ ;  $P<0,001$ ). Os testes *post hoc* mostraram que houve redução na concentração de hemoglobina 24-h após ozonioterapia, em comparação com as demais amostras ( $P<0,05$ ). Houve aumento na concentração de CHCM nas amostras coletadas no 7-dias após ozonioterapia em comparação com as concentrações registradas nas demais ( $P<0,05$ ). Houve redução na atividade sérica da AST nas amostras coletadas no 7-dias após ozonioterapia em comparação com as demais ( $P<0,05$ ). Adicionalmente, esfregaços sanguíneos 24-h após ozonioterapia apresentaram hemácias com deformidade da membrana. Contudo, amostras coletadas 7-dias após ozonioterapia não apresentaram alterações na morfologia das hemácias. Nenhum animal apresentou manifestação clínica durante todo experimento. Entretanto, houve aumento discreto na pontuação da dor (antes:  $4,2 \pm 0,4$ , durante:  $5,3 \pm 0,4$ ;  $F_{1,107} = 5,20$ ;  $P = 0,025$ ). Isso indica a necessidade de sedação para a administração do ozônio via intrarectal. A redução na concentração de hemoglobina era esperada porque o dano oxidativo leva a desnaturação dessa proteína o que gera uma hipóxia transitória e isso estimula a medula óssea a produzir novos eritrócitos que são mais ricos em enzimas antioxidantes e com maior concentração de hemoglobina. O que torna estas células mais reativas com oxigênio (CHCM), melhorando a perfusão tecidual. A AST diminuída 24-h após ozonioterapia, reforça que não houve dano hepático, um dos possíveis efeitos colaterais da ozonioterapia. Conclui-se que aplicação do ozônio insuflado via intrarectal é seguro e apresentou efeitos positivos para recuperação de cavalos usados em esporte.

**Palavras-chave:** cavalos atletas; equinos; estresse oxidativo; hemácias; ozonioterapia.

## Evaluation of hematological and biochemical profiles and pain in sport horses submitted to ozone therapy

### ABSTRACT

Medical ozone is used in various treatments due to its oxidizing action. We aimed here to evaluate the impact of intrarectal ozone therapy on hematological and biochemical parameters, as well as the pain induced by the procedure in sport horses. Blood samples from 12 horses collected before treatment (Control), 24 hours after ozone treatment (24-h after ozone therapy) and seven days after the end of the last day of ozone therapy (7-days after ozone therapy) were analyzed. Pain assessment, clinical evaluation and determination of heart rate (HR) and respiratory rate (RR) were also carried out before and after ozone therapy. The experimental phase affected both the hemoglobin ( $F_{2,20}=5.55$ ;  $P=0.012$ ) and mean corpuscular hemoglobin (MCHC) concentrations ( $F_{2,20}=16.01$ ;  $P<0.001$ ), as well as the serum aspartate amino transferase (AST) activity ( $F_{2,20}=20.49$ ;  $P<0.001$ ). The post hoc tests showed that there was a reduction in the concentration of hemoglobin 24 hours after ozone therapy, compared to the other samples ( $P<0.05$ ). There was an increase in the concentration of MCHC in the samples collected on the 7th day after ozone therapy compared to the concentrations recorded in the other samples ( $P<0.05$ ). There was a reduction in serum AST activity in the samples collected on the 7th day after ozone therapy compared to the other samples ( $P<0.05$ ). Furthermore, blood smears taken 24-hours after ozone therapy showed red blood cells with membrane deformities. However, samples taken 7-days after ozone therapy showed no changes in the morphology of the red blood cells. Additionally, no animals exhibited any clinical manifestations throughout the experiment. However, there was a slight increase in the pain score (before:  $4.2\pm 0.4$ , during:  $5.3\pm 0.4$ ;  $F_{1,107}=5.20$ ;  $P=0.025$ ). This result highlights the need for sedation for intrarectal ozone administration. The reduction in hemoglobin concentration was expected because oxidative damage leads to denaturation of this protein, which generates transient hypoxia and stimulates the bone marrow to produce new erythrocytes which are richer in antioxidant enzymes and have a higher concentration of hemoglobin. This makes these cells more reactive with oxygen (CHCM), improving tissue perfusion. The lower AST recorded 7-days after ozone therapy shows that there was no liver damage, one of the possible side effects of ozone therapy. Therefore, the intrarectal ozone therapy is safe and has positive effects on the recovery of sport horses.

**Keywords:** equines; oxidative stress; ozone therapy; red blood cells; sport horses.

## 6 INTRODUÇÃO

A ozonioterapia é uma terapia alternativa para tratar diversas condições de saúde. O ozônio é um gás naturalmente presente na atmosfera e possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Bocci, 2002; Bhatt et al., 2016; Vendruscolo et al., 2018; Sciorsci, 2020). A ozonioterapia pode afetar as enzimas bioquímicas do organismo de diferentes maneiras alterando sua atividade e função devido ao seu potencial oxidante (Haddad et al., 2009b). Em alguns casos, a ozonioterapia pode estimular a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx), que ajudam a neutralizar os radicais livres e proteger as células contra danos oxidativos (Bocci, 2004). Por outro lado, a ozonioterapia também pode inibir a atividade de enzimas pró-inflamatórias, como a ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX), que estão envolvidas na produção de mediadores inflamatórios (Bocci et al., 2011; Viebahn-Hansler et al., 2012; Bhatt et al., 2016; Galie et al., 2018; Siniscalco et al., 2018). Contudo, mais pesquisas são necessárias para entender melhor esses efeitos e determinar as melhores práticas para seu uso.

A ozonioterapia em equinos tem o potencial de melhorar a circulação sanguínea, aumentar a oxigenação dos tecidos, estimular o sistema imunológico e reduzir a inflamação, e não altera as concentrações dos principais biomarcadores de inflamação e catabolismo da cartilagem quando utilizado por via intra-articular, como verificado por Vendruscolo et al. (2018). Por estes motivos, o ozônio é usado para tratar condições como feridas de difícil cicatrização, infecções, problemas musculares e articulares, entre outros (Smith et al., 2017; Sciorsci et al., 2020). Desta forma, a ozonioterapia pode se tornar uma ferramenta para recuperação de cavalos de esporte, usualmente sujeitos a lesões musculares e articulares (Casey, 2007). Como em humanos, a ozonioterapia em equinos envolve a administração de ozônio por diferentes vias tais como: reperfusão de soro ozonizado (Alves et al., 2004); subcutânea (Ballardini, 2005); auto-hemoterapia (Ballardini, 2006; Haddad et al., 2009ab; Tsuzuki et al., 2015); tópica intra-articular (Vendruscolo et al., 2018). Apenas um estudo testou a via intrarectal (Jaramillo et al., 2020). A via intrarectal é considerada relativamente menos invasiva em comparação com as demais. Além disso, sua aplicação é relativamente simples, por não necessitar de materiais como bolsa de transfusão, cateter, equipo, dentre outros que aumentam o risco de contaminação e elevam o custo do procedimento. No entanto, a ozonioterapia em equinos ainda é controversa e não é amplamente reconhecida pela comunidade veterinária

convencional, uma das razões é falta de padronização dos protocolos de tratamento. Adicionalmente, na literatura consultada não foram encontrados estudos que avaliaram o uso da ozonioterapia pela via intrarretal em cavalos atleta. Portanto, neste estudo pretende-se testar a hipótese de que a ozonioterapia é uma terapia segura e benéfica para cavalos de esporte em fase de recuperação após temporada de provas. Objetivou-se aqui avaliar os efeitos da ozonioterapia via intrarretal nos parâmetros hematológicos e bioquímicos além da percepção da dor causada pelo procedimento em cavalos de esporte. Caso a ozonioterapia de fato melhore a circulação sanguínea e o fornecimento de oxigênio aos tecidos (Martínez-Sánchez et al., 2012; Seyam et al., 2018; Jaramillo et al., 2020), espera-se o aumento de hemoglobina, eritrócitos e alteração positiva na morfologia das células sanguíneas. Como a administração do ozônio via intrarretal não provocou alterações clínicas e tampouco variações nos parâmetros fisiológicos (Jaramillo et al., 2020), espera-se o mesmo no presente estudo. Caso a ozonioterapia produza efeitos analgésicos (Schwartz; Martínez-Sánchez, 2012) espera-se que quando administrada por via intrarretal não haja manifestação de dor pelos cavalos.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (Protocolo de autorização: #013/22).

### *7.1 Seleção dos animais, dose e concentração de ozônio*

Foram usados 12 cavalos usados em provas de baliza e tambores da raça quarto de milha mantidos em um haras na cidade de Itapé, Bahia, Brasil, sendo nove fêmeas e três machos castrados, com idade entre 4 e 12 anos. No local, todos os animais são submetidos ao mesmo manejo de alimentação, moradia e regime de treino. São oferecidos aos animais feno (x kg) e ração (y kg) no início da manhã e no final da tarde. Todos eles vivem em baias e são montados para exercício de alongamento e aquecimento uma vez por dia durante 30 minutos cinco dias na semana. Destes cinco dias, dois são feitos treinos forçados que consistem em trote alongado por 10 minutos, subir serra e galopar em círculos por 20 minutos, além de usar os percursos com obstáculos. Todos os animais participam regularmente de provas da modalidade três tambores e os dados foram coletados um mês depois do fim da temporada de provas que correspondeu ao mês de outubro de 2023. Inicialmente, todos foram examinados clinicamente

por médica veterinária e considerados saudáveis. A ordem de aplicação da ozonioterapia foi aleatória e a mesma ocorreu no início da manhã antes de qualquer atividade rotineira dos animais.

Para administração da ozonioterapia os animais foram colocados no tronco de contenção individualmente. Antes da preparação dos animais para administração do ozônio ( $O_3$ ) e imediatamente após o término da sua administração foram aferidas as frequências cardíaca e respiratória com estetoscópio durante 1 minuto. Para este fim, foi usado o aparelho gerador de ozônio medicinal modelo Ozonic Vet ® (Ozonic, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) e uma mangueira de silicone acoplada a uma sonda de coleta de embrião para insuflação retal. Antes da aplicação do ozônio, as fezes foram removidas e a sonda foi introduzida no reto do animal, aproximadamente 0,10m, e o aparelho foi regulado para fluxo de 1/8 que corresponde a 125mL/min e concentração de 30 $\mu$ g  $O_3$ /mL. Com esses dados e o peso dos animais (Tabela 1) foi calculado o tempo em que a sonda ficou no reto de cada animal até atingir a dose de 60 $\mu$ g  $O_3$ /kg com base em ISCO3 (2020). Foram realizadas cinco aplicações com intervalo de 48 horas entre elas.



Tabela 1. Características dos animais e duração de aplicação da ozonioterapia.

Animal	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Duração (minutos)
1	Fêmea	12	325	5
2	Fêmea	6	320	5
3	Fêmea	11	370	6
4	Fêmea	6	370	6
5	Fêmea	4	420	7
6	Fêmea	4	420	7
7	Fêmea	4	420	7
8	Fêmea	8	465	8
9	Fêmea	8	500	8
10	Macho	12	415	7
11	Macho	5	380	6
12	Macho	6	450	7

### ***7.2 Coleta sanguínea e processamento das amostras***

Amostras de sangue foram colhidas três dias antes do início da administração da ozonioterapia tratamento (Controle), um dia depois do quinto e último dia de sua administração (24h após ozonioterapia) e novamente sete dias depois do último dia de ozonioterapia (7-dias após ozonioterapia). As coletas de amostras de sangue ocorreram no início da manhã por punção da veia jugular com agulha (40 × 12mm) e seringa (10 mL) descartáveis e transferido para tubos de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) K3 como anticoagulante e outro sem anticoagulante. Imediatamente após a coleta também foram feitos esfregaços sanguíneos, duas lâminas por animal. Todas as amostras coletadas foram armazenadas em caixa isotérmica com gelo reciclável e transportado ao Laboratório de Análises Clínicas da UESC onde foram

processadas. A morfologia das hemácias foi avaliada em relação a integridade de membrana, tamanho, forma e coloração a partir dos esfregaços sanguíneos (Satué *et al.*, 2013).

No laboratório, as lâminas com os esfregaços foram coloradas com kit Panótico Rápido. Para as amostras de sangue foi usado um contador automatizado de células sanguíneas (ABX vet da Horiba) para a análise de: eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ ), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (VCM) (f/L), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (f/L) e leucócitos ( $/\mu\text{L}$ ). Por meio da leitura de lâmina em óleo de imersão e objetiva de 100x no microscópio foram analisados: neutrófilos (%), eosinófilos (%), linfócitos (%), monócitos (%), basófilos (%). A partir da leitura das lâminas foram contadas as plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ). Por meio de refratometria foram determinadas as proteínas plasmáticas totais (PPT) (g/dL) e o fibrinogênio. Finalmente, por meio de kits bioquímicos comerciais Bioclin® com leitura em analisador bioquímico semiautomático Bioplus 2000 foram avaliadas as seguintes enzimas: aspartato amino transferase (AST), creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e gama glutamil transferase (GGT).

### **7.3 Gravação de imagens dos animais para avaliação da dor**

Imagens dos animais foram gravadas durante cinco minutos antes da administração da ozonioterapia e, novamente, por cinco minutos durante sua administração com câmera Nikon® e com câmera de celular modelo Xiaomi Redmi Note 9, ambas fixadas em tripés e posicionadas a 1,0 m do animal em frente e diagonal para que as expressões faciais fossem captadas no vídeo. Os vídeos foram salvos no final do dia em HD externo e na nuvem do Google Drive®.

Posteriormente, foram feitos vídeo cliques com duração de 30 segundos cada, que foram avaliados por três observadores com prática em observação comportamental e cegos às fases experimentais (antes ou durante a ozonioterapia). Os vídeo cliques foram feitos a partir de imagens coletadas dos últimos minutos da aplicação para todos os animais. Os observadores analisaram os vídeo cliques usando a escala de dor *Horse Grimace Scale* (HGS) estabelecida para imagens estáticas ('fotografias') de equinos (Dalla Costa *et al.*, 2014). Neste estudo foi usada a HGS porque esta varia de zero a 12, enquanto a *Equine Pain Face* (EPF), usualmente usada para avaliar a expressão de dor em vídeo cliques, varia de zero a 4 e (Gleerup e Lindegaard, 2016). Desta forma, por ser mais extensa, a HGS pode permitir a determinação de mais nuances na percepção da dor do que a escala EPF.

Inicialmente, cada observador recebeu a descrição detalhada das seis unidades de ação facial (sigla em inglês: FAUs) e o sistema de pontuação. Resumidamente, para cada videoclipe,

cada observador deu uma pontuação para cada FAU que variou da seguinte forma: 0 = dor não presente, 1 = dor moderadamente presente, 2 = dor obviamente presente). A soma das pontuações individuais de cada uma das seis FAUs resultou da HGS em cada imagem. A pontuação máxima possível do HGS é 12, quando o observador dá uma pontuação de 2 para cada uma das seis FAUs. Na sequência, os observadores foram capacitados no uso de escalas de dor em equinos. Para esta capacitação, foram selecionadas aleatoriamente 10 imagens que foram avaliadas pelos observadores de forma individualizada usando a escala de dor HGS. Em seguida, as pontuações na escala de dor foram comparadas e determinou-se o índice de concordância de Kendall entre os observadores de 0,80 ( $P < 0,023$ ). Posteriormente, todos os vídeos foram distribuídos de forma aleatória e igualitária entre os três observadores para sua avaliação individualizada.

### ***Análise dos dados***

Para comparar as médias dos dados das amostras de sangue foi usado o modelo linear de efeitos mistos (MLEM), usando um modelo para cada variável. Em cada modelo o sexo (macho ou fêmea) e a fase experimental (Controle, 24h após ozonoterapia e 7-dias após ozonoterapia – para os dados das amostras de sangue ou antes e imediatamente depois da ozonoterapia – para os dados de FC e FR) e a interação entre sexo e fase experimental foram considerados como fatores fixos (variáveis independentes). Adicionalmente, em cada modelo a identidade dos indivíduos foi considerada como fator aleatório o que permitiu controlar as dependências de medidas repetidas. Os resíduos de cada modelo foram checados graficamente quanto à distribuição normal e homocedasticidade e a transformação logarítmica foi usada para os dados de CK e PPT para satisfazer estes pressupostos.

As médias das frequências cardíacas e respiratórias (FC e FR, respectivamente) e da escala de dor *Horse Grimace Scale* (HGS) também foram comparadas por meio de MLEM – também usando um modelo para cada variável. Nestes modelos o sexo (macho ou fêmea) e a fase experimental (antes ou durante a ozonoterapia) e o dia de aplicação (1º ao 5º dia), além das interações entre sexo, fase experimental e dia de aplicação foram considerados como fatores fixos (variáveis independentes). Nestes modelos, a identidade dos indivíduos também foi considerada como fator aleatório para controlar as dependências de medidas repetidas. Os resíduos de cada modelo foram checados graficamente quanto à distribuição normal e homocedasticidade e foram considerados satisfatórios. Para todas as análises, foi usado o

software Minitab 19.1 (Minitab Inc., State College, PA), considerando  $\alpha < 0,05$ . Os dados são apresentados na forma de médias dos mínimos quadrados  $\pm$  erro padrão.

## 8 RESULTADOS

Houve efeito da fase experimental nas concentrações de hemoglobina ( $F_{2,20} = 5,55$ ;  $P = 0,012$ ), hemoglobina corpuscular média (CHCM) ( $F_{2,20} = 16,01$ ;  $P < 0,001$ ) e na atividade sérica da aspartato amino transferase (AST) ( $F_{2,20} = 20,49$ ;  $P < 0,001$ ). Os testes *post hoc* mostraram que houve redução ( $P < 0,05$ ) na média da concentração de hemoglobina nas amostras coletadas 24-h após ozonioterapia ( $9,7 \pm 0,3$ ), em comparação com as amostras sanguíneas colhidas nas fases Controle ( $11,3 \pm 0,5$ ) e 7-dias após ozonioterapia ( $11,6 \pm 0,4$ ) (Figura 1). Por outro lado, houve aumento ( $P < 0,05$ ) na média da concentração de CHCM nas amostras de sangue colhidas 7-dias após ozonioterapia ( $33,0 \pm 0,4$ ) em comparação com as médias registradas nas fases Controle ( $32,1 \pm 0,5$ ) e 24 h após ozonioterapia ( $32,1 \pm 0,6$ ) (Figura 2). Adicionalmente, houve redução ( $P < 0,05$ ) na atividade sérica da AST nas amostras colhidas 7-dias após ozonioterapia ( $84,0 \pm 23,8$ ) em comparação com as demais (Controle:  $254 \pm 27,8$  e 24 h após ozonioterapia:  $275 \pm 11$ ). O sexo e a interação entre sexo e fase experimental não afetaram a concentração de hemoglobina ( $P > 0,05$ ), CHCM ( $P > 0,05$ ) e AST ( $P > 0,05$ ).

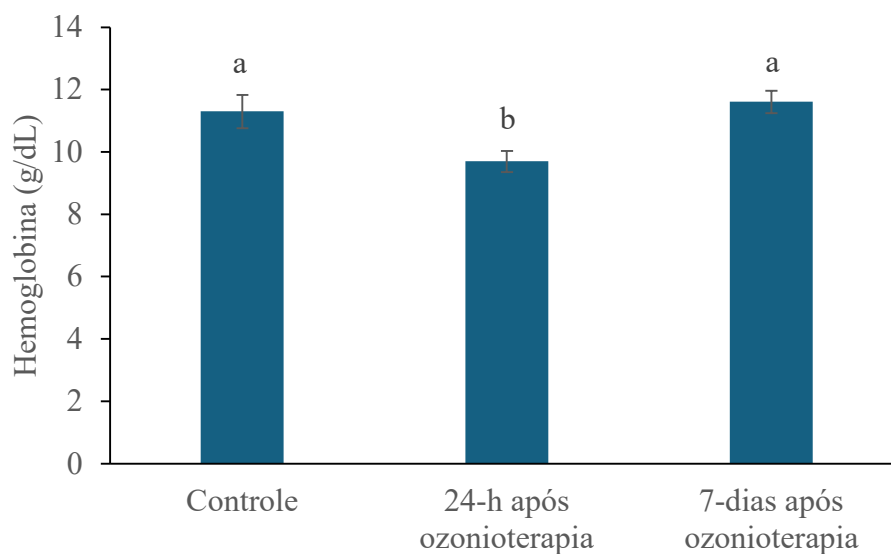


Figura 1 – Médias ( $\pm$  erro padrão - EP) de hemoglobina (g/dL) de acordo com a fase experimental. Letras distintas acima das barras indicam diferença significativas entre as médias ( $P < 0,05$ ).

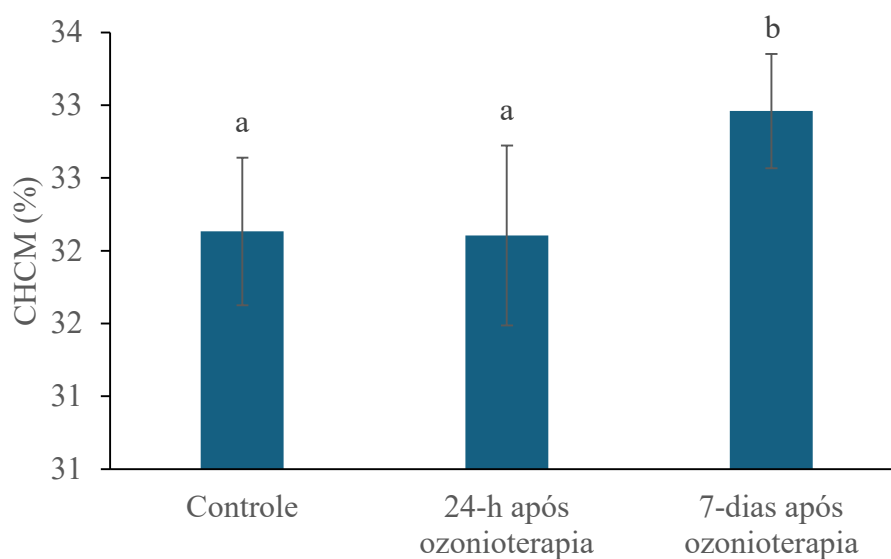


Figura 2- Médias ( $\pm$  EP) de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%) de acordo com a fase experimental. Letras distintas acima das barras indicam diferença significativas entre as médias ( $P < 0,05$ ).

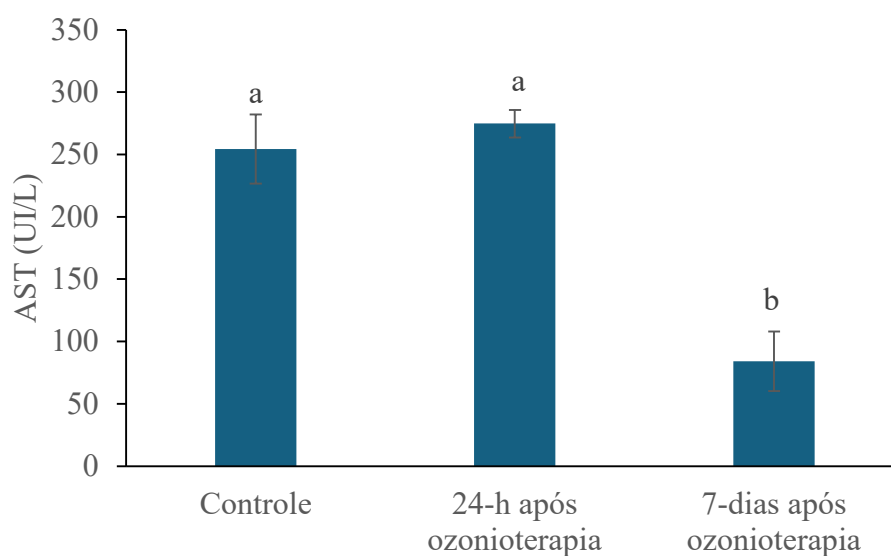


Figura 3- Médias ( $\pm$  EP) de aspartato amino transferase (AST) (UI/L) de acordo com a fase experimental. Letras distintas acima das barras indicam diferença significativa entre as médias ( $P < 0,05$ ).

Houve tendência de efeito da fase experimental na concentração de fibrinogênio ( $F_{2,20} = 3,18$ ;  $P = 0,063$ ), com uma tendência de aumento na concentração de fibrinogênio nas amostras de sangue colhidas 7-dias após ozonioterapia (Tabela 2). Os outros parâmetros do hemograma, como eritrócitos, hematócrito e neutrófilos e bioquímicos, como creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e gama glutamil transferase (GGT) encontravam-se dentro dos valores de referência esperados para a espécie equina de “sangue quente” e não foram afetadas pela fase experimental (Tabela 2). O sexo ou interação entre sexo e fase experimental também não afetaram essas variáveis (vide as análises completas apresentadas no Apêndice).

Tabela 2. Efeito da fase experimental (Controle, 24h após a ozonoterapia e 7-dias após a ozonoterapia) sobre as médias as médias (EP: erro padrão) dos parâmetros do hemograma e bioquímicos de equinos (N = 12) submetidos a ozonioterapia intrarretal.

VARIÁVEL	Controle	EP	24-h*	EP	7-dias*	EP	F	P
AST (UI/L)	254,4	27,8	274,8	11,0	84,3	23,8	$F_{2,20} = 20,49$	<0,001
Hemoglobina (g/dL)	11,6	0,6	9,7	0,5	11,3	0,4	$F_{2,20} = 5,55$	0,012
CHCM (%)	32,1	0,1	32,1	0,1	33,0	0,2	$F_{2,20} = 16,01$	<0,001
GGT (UI/L)	13,8	1,0	14,9	1,1	14,4	1,0	$F_{2,20} = 0,35$	0,710
CK (UI/L)	204,1	32,3	223,5	48,8	231,0	28,2	$F_{2,20} = 0,42$	0,662
LDH (UI/L)	760,0	211,0	474,3	33,1	584,4	81,0	$F_{2,20} = 0,37$	0,695
Fibrinogênio (mg/dL)	250,0	26,1	283,3	29,7	350,0	35,9	$F_{2,20} = 3,18$	0,063
VG (%)	34,1	1,9	32,9	1,7	34,9	1,1	$F_{2,20} = 2,56$	0,103
Hemácias (célx10 <sup>6</sup> /μL)	7,3	0,4	6,9	0,4	7,4	0,2	$F_{2,20} = 2,69$	0,092
Linfócitos Absolutos (cél/μL)	3731,0	449,0	4066,0	583,0	3885,0	471,0	$F_{2,19,2} = 0,19$	0,826
Linfócitos Relativos (%)	34,8	3,0	39,3	3,2	40,8	3,7	$F_{2,20} = 1,01$	0,383
Monócitos Absolutos (cél/μL)	596,0	108,0	448,5	93,7	559,6	81,6	$F_{2,29} = 0,74$	0,484
Monócitos Relativos (%)	5,7	0,7	4,3	0,8	5,6	0,8	$F_{2,20} = 1,7$	0,200
Eosinófilos Absolutos (cél/μL)	273,8	40,5	293,3	60,6	234,5	48,1	$F_{2,20} = 0,24$	0,785
Eosinófilo Relativos (%)	2,9	0,4	3,1	0,6	2,4	0,5	$F_{2,20} = 0,41$	0,671
Basófilos Relativos (%)	118,6	41,3	27,6	12,1	78,8	22,5	$F_{2,20} = 2,88$	0,077
Plaquetas (unidade/μL)	245417	19173	191333	15799	236400	19884	$F_{2,19,81} = 1,01$	0,383
PPT (g/dL)	6,6	0,1	6,4	0,1	6,1	0,6	$F_{2,18,98} = 2,24$	0,134

\*24-h: 24-h após a ozonioterapia; 7-dias: 7-dias após a ozonioterapia.

Os esfregaços das amostras sanguíneas coletadas três dias antes da administração da ozonioterapia apresentaram hemácias íntegras sem deformidade da membrana (Figura 4a). Contudo, os esfregaços das amostras sanguíneas coletadas 24 horas após a ozonioterapia apresentaram hemácias com deformidade da membrana compatível com lesões oxidativas (Figura 4b). Por sua vez, amostras coletadas 7 dias após a ozonioterapia não apresentaram alterações na morfologia das hemácias (Figura 4c). Nenhum animal apresentou manifestação clínica durante todo experimento.

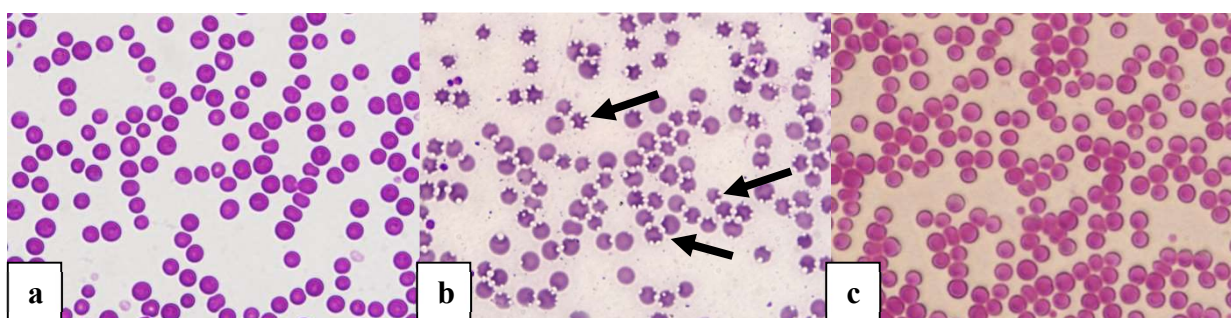


Figura 4 – Imagens das hemácias nos esfregaços sanguíneos (ampliação 100x) nas fases experimentais: Controle - três dias antes da ozonioterapia (a); 24 h depois da administração do ozônio (b) as setas na figura destacam algumas das membranas celulares danificadas; 7 dias depois do último dia da ozonioterapia (c).

As médias da escala de dor *Horse Grimace Scale* (HGS) não foram afetadas pela fase experimental ( $F_{1,90} = 3,05$ ;  $P = 0,085$ ), dia da administração ( $F_{4,90} = 0,38$ ;  $P = 0,821$ ), sexo ( $F_{1,10} = 2,90$ ;  $P = 0,119$ ) ou suas interações (vide análise estatística completa no Anexo) quando analisado o modelo estatístico completo. Contudo, quando reaplicado o modelo depois de retirados os fatores sexo e dia, a fase experimental passa a ter efeito significativo fase experimental ( $F_{1,107} = 5,20$ ;  $P = 0,025$ ). A pontuação média da HGS subiu de  $4,2 \pm 0,4$  para as imagens registradas antes administração da ozonioterapia para  $5,3 \pm 0,4$  durante sua administração. Contudo, não houve efeito da fase experimental nas médias de frequência cardíaca ( $F_{1,90} = 0,25$ ;  $P = 0,617$ ) e de frequência respiratória ( $F_{1,90} = 0,27$ ;  $P = 0,603$ ) registradas antes (FC:  $38,2 \pm 0,5$ ; FR:  $21,3 \pm 0,5$ ) e imediatamente após aplicação do ozônio (FC:  $38,6 \pm 0,5$ ; FR:  $21,6 \pm 0,5$ ). A FC e a FR também não foram afetadas pelo sexo e pela interação entre sexo, fase experimental e dia de administração quando analisado o modelo estatístico completo (vide análise estatística completa no Apêndice) e tampouco quando



reaplicado o modelo depois de retirados os fatores sexo e dia, a fase experimental (FC:  $F_{1,107} = 0,79$ ;  $P = 0,375$ ; FR:  $F_{1,107} = 0,23$ ;  $P = 0,6325$ ).

## 9 DISCUSSÃO

Verificou-se que após a ozonioterapia as hemácias apresentam lesões oxidativas em sua estrutura, o que não era esperado. Em estudo anterior no qual também foi administrado ozônio via intrarretal em cavalos, não foram relatadas essas alterações (Jaramillo et al., 2021). O dano oxidativo às hemácias pode estar associado à peroxidação lipídica da membrana, à desnaturação da hemoglobina ou a uma alteração no estado de valência do átomo de ferro quando a célula é exposta a agentes oxidantes (Satué et al., 2013), como o ozônio usado aqui. Porém, mesmo com essas lesões, as variáveis sanguíneas se mantiveram dentro dos valores de referência. Adicionalmente, não foram observadas alterações em todas as hemácias dos esfregaços das amostras coletadas 7 dias depois da ozonioterapia. Isso mostra que o processo de lesão oxidativa foi transitório e controlado sete dias depois do último dia de administração da ozonioterapia devido ao estímulo a renovação celular.

Esse resultado pode ser interessante na recuperação de cavalos de esporte. De acordo com Bocci (2004) eritrócitos jovens são mais leves e contêm mais glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) do que células mais antigas que são mais pesadas. Além disso, nos eritrócitos naturalmente estão presentes outras potentes enzimas antioxidantes (catalase, GSH-Rd, GSH-Px, GSH-Tr e SOD) o que pode promover a melhoria no condicionamento físico de cavalos de esporte. Uma vez que essas enzimas podem eliminar rapidamente grandes quantidades de oxidantes gerados durante o exercício físico aumentando a perfusão e oxigenação tecidual aliado ao aumento da hemoglobina que é a proteína que carrega o oxigênio no eritrócito até os tecidos (Satué et al., 2013; Bocci et al., 2011; Smith et al., 2017; Seyam et al., 2018). Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a terapia com ozônio pode aumentar a geração de eritrócitos com características metabólicas melhoradas. Esses resultados corroboram Bocci et al. (2011) que sugeriram que as células pós ozônio seriam uma espécie de ‘eritrócitos superdotados’. Este tipo de eritrócito seria capaz de corrigir a hipóxia em doenças vasculares e a hipóxia muscular gerada após o esforço do exercício, no caso de cavalos de esporte.

O ozônio ao reagir com os compostos lipídicos da membrana das hemácias de sangue humano gera os produtos da oxidação lipídica (LOP) (Bocci et al., 2004, 2011). Bocci et al. (2004, 2011) afirmaram que sessões terapêuticas repetidas podem permitir que os compostos

LOP atinjam a medula óssea e ativem um desenvolvimento sutil no nível eritropoiético. Com isso, é estimulada a formação de novos eritrócitos. Porém, o mecanismo pelo qual isso acontece não está totalmente elucidado. É razoável supor que as células oxidadas, como as verificadas no presente estudo, ao serem substituídas também contribuam para essa ativação medular, pois com a diminuição da hemoglobina ocorre uma hipóxia transitória que estimularia a eritropoiese, o que precisa ser confirmado em estudos futuros por meio de avaliação renal. Estudos anteriores que utilizaram auto-hemoterapia com ozônio em equinos também não relataram alterações na morfologia das hemácias (Tsuzuki et al., 2015; Haddad et al., 2009a). O fato dos animais usados no presente estudo participem de competições, submetidos a uma rotina diária de treino, possivelmente tenha afetado os resultados. Porque o estresse oxidativo causado pelo exercício é potencialmente maior em cavalos de esporte do que naqueles que foram usados nos estudos anteriores. No presente estudo, verificou-se alteração de membrana das hemácias e, de acordo com Satué et al. (2013) células danificadas são removidas da circulação e isso pode explicar a diminuição da hemoglobina após a ozonioterapia. Adicionalmente, houve aumento do CHCM e da hemoglobina sete dias depois do fim da administração do ozônio (7 dias após ozonioterapia) em comparação com o Controle, semelhante ao que foi descrito por Jaramillo et al. (2020). Portanto, é importante ressaltar que a melhora na condição das hemácias sete dias após o tratamento contraindica a aplicação do tratamento na véspera das competições, devendo ser realizado com antecedência de pelo menos uma semana para a última aplicação.

Como o esperado, os animais do presente estudo não apresentaram sintomatologia clínica e as enzimas que avaliam o perfil hepático se mostraram reduzidas. Apesar do fibrinogênio não ter apresentado efeito estatístico significativo, houve uma tendência a se elevar, isso pode ser decorrente da presença de radicais livres ou devido as lesões nas hemácias, pois nos equinos essa proteína sinaliza um processo inflamatório. A AST foi menor ao final do experimento (7 dias após ozonioterapia). Este é um dado curioso porque essa enzima tende a aumentar durante o exercício devido ao aumento da permeabilidade do sarcolema e permanece na circulação por 24 horas (Câmara e Silva et al., 2007; Assenza et al., 2016). Essa diminuição pode sugerir que, uma semana após o uso do ozônio, houve maior estabilidade das membranas das células musculares e hepáticas. Possivelmente, também deve ter havido diminuição da produção de metabólitos gerados após o estresse muscular que seriam metabolizados pelo fígado como por exemplo ácido láctico, principal metabólito gerado pela via anaeróbica quando a demanda de ATP não é suprida pela respiração aeróbica. O que precisa ser confirmado em estudos futuros.

Os efeitos positivos do ozônio como o aumento da CHCM e hemoglobina aliados a diminuição da AST aconteceram sete dias depois do fim de sua administração. Desta forma, o efeito da ozonioterapia se dá de forma tardia. Este resultado corrobora Bocci et al. (2011) que sugeriram o efeito tardio, ao ‘despertar’ o organismo para ativação do metabolismo celular. Em resumo, caso a ozonioterapia de fato melhore a oxigenação tecidual e a capacidade antioxidante, a demanda pela via anaeróbica é diminuída. Além disso, as lesões musculares causadas pelo estresse oxidativo também diminuiriam e, em consequência, a recuperação dos cavalos é mais eficiente uma vez que não há acúmulo demasiado de ácido láctico nem de agentes oxidantes que são os principais causadores de lesão muscular, dor e queda de rendimento (Kinnunem et al., 2005; Bottegaro et al., 2018). Em geral, a segurança do ozônio é muito questionada devido ao seu alto poder oxidante. Porém, quase não há relatos de efeitos colaterais. Mesmo assim, verificou-se que, quando ocorreram, tais efeitos colaterais estavam relacionados ao uso incorreto da técnica (ISCO3, 2020). Os resultados do presente estudo permitem afirmar que o ozônio pode promover a melhora nos indicadores de recuperação muscular e é seguro por não causar danos hepáticos. Contudo, os dados aqui obtidos podem ser criticados devido ao tamanho pequeno da amostragem, especialmente para os machos (N = 3), o que limitaria sua validade. Entretanto, o relato do treinador destes animais, que afirmou ter sentido melhora no desempenho, aparentemente confirma os resultados averiguados e aponta para a direção da necessidade de mais estudos. Desta forma, um estudo com um número maior de animais e que seja seguido de testes de desempenho esportivo dos cavalos que participam de competições em recuperação, que permitam a comparação antes e depois da ozonioterapia, deve ser feito para fundamentar a sua aplicação como terapia benéfica e segura para cavalos de esporte. Adicionalmente, a ozonioterapia via intrarectal promoveu respostas mais positivas que a ozonioterapia via hematológica como o aumento da hemoglobina e da CHCM, por exemplo. Entretanto, ozonioterapia via intrarectal é menos invasiva do que a via auto-hemoterapia porque diminui o risco de exposição a infecção do sistema sanguíneo pelo paciente, além de ser mais simples a sua aplicação e não necessitar de outros materiais, tais como bolsa de transfusão, cateter, equipo que aumentam o risco de contaminação e elevam os custos do procedimento.

Apesar dos resultados positivos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, os animais no presente estudo apresentaram aumento discreto nas médias da escala de dor *Horse Grimace Scale* (HGS) avaliada nas imagens registradas antes da ozonioterapia comparada com as registradas durante a aplicação do gás (de  $4,2 \pm 0,4$  para  $5,3 \pm 0,4$ ). Esta alteração, contudo, não foi refletida na frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) dos animais, também usadas

como indicadores de dor ou estresse (Gleerup e Lindegaard, 2016). É possível que o fato de os animais usados no estudo serem usados em competições esportivas e, portanto, submetidos a treinamento constante, explique a falta de alterações tanto na FC quanto na FR em decorrência da ozonioterapia. Animais usados em competições, normalmente, apresentam condicionamento cardiorrespiratório e, portanto, pouca variação na FC e FR (Trilk et al., 2002). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a administração do ozônio via intrarretal provoca dor nos animais. Por este motivo, indica-se o uso de sedação para a administração do ozônio via intrarretal. Antes de seu uso, contudo, estudos futuros devem avaliar os efeitos da sedação sobre os parâmetros da ozonioterapia.

## 10 CONCLUSÃO

A ozonioterapia via intrarretal em equinos, avaliado por hemograma e exame bioquímico, revelou resultados positivos ao ser analisada a hemoglobina, CHCM e morfologia de hemácias com aumento quantitativo após sete dias de sua aplicação, ao passo que houve redução da AST. É importante realçar, contudo que esfregaços das amostras sanguíneas coletadas 24 horas após a ozonioterapia apresentaram hemácias com deformidade da membrana compatível com lesões oxidativas. Adicionalmente, houve aumento na percepção da dor indicando, portanto, a necessidade de sedação para administração do ozônio via intrarretal. A AST diminuída 24-h após ozonioterapia, reforça que não houve dano hepático, um dos possíveis efeitos colaterais da ozonioterapia. Estes achados apontam para o potencial impacto positivo dessa abordagem terapêutica, indicando promissoras perspectivas para aplicação clínica do ozônio para recuperação de cavalos de esporte, abrindo portas para futuras investigações e aprimoramento das estratégias terapêuticas na medicina veterinária.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1 jan. 1984.
- ALTMANN, J. “Observational Study of Behavior: Sampling Methods”. **Behaviour**, vol. 49, no. 3/4, 1974, pp. 227–67.
- ALVES, G. E. S.; ABREU, J. M. G.; RIBEIRO FILHO, J. D.; MUZZI, L. A. L.; OLIVEIRA, H. P.; TANNUS, R. J.; BUCHANAN, T. Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 433–437, 2004.

ASSENZA, A.; MARAFIOTI, S.; CONGIU, F.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F.; BRUSCHETTA, D.; PICCIONE, G. Serum muscle-derived enzymes response during show jumping competition in horse, **Veterinary World**, 9(3): 251-255, 2016.

BALLARDINI, E. Oxygen-ozone therapy for spinal muscle. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 4, p. 70–73, 2005.

BALLARDINI, E. Changes in haemochromocytometric values in horses after ozone autohaemotransfusion. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 5, p. 47–52, 2006.

BALOGH, N.; GAAL, T.; RIBICZEYNE, P.S.; PETRI A. Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 30, n.4, p. 214-218, 2001.

BHATT, J.; BHAT, A. R.; DHAMA, K.; AMARPAL, A. An overview of ozone therapy in equine: an emerging healthcare solution. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, Volume 4, p. S203–210, 2016.

BOCCI, V. A. Oxygen-Ozone therapy: A critical evaluation. **The Netherlands: Kluwer Academic Publisher**. Dordrecht, 2002.

BOCCI V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of Inflammation**. Feb;13(1):3-11, 2004. doi: 10.1080/0962935062000197083.

BOCCI, V. A. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, n. 3, p. 493–504, 2006a.

BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research**, v. 37, n. 4, p. 425–35, 2006b.

BOCCI, V. A.; ZANARDI, I. & TRAVAGLI, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. **Journal of Translational Medicine**. v. 9, n. 66, 2011.

BOCCI, V. A.; ZANARDI, I. & TRAVAGLI, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. **Journal of Translational Medicine**. v. 9, n. 66, 2011.

BOFFI, F. M. Pathologies affecting the athletic performance. Muscle disorders. In: **Equine Exercise Physiology**. Blockwell, Buenos Aires. p145-151, 2007.

BOTTEGARO, N. B.; ŠURAN, J.; D.; AR, K.; K.; VRBANAC, Z. Effect of prolonged submaximal exercise on serum oxidative stress biomarkers (d-ROMs, MDA, BAP) and oxidative stress index in endurance horses. **BMC Veterinary Research** 14:216, 2018.

CALUNGA, J. L.; MENÉNDEZ, S.; LEÓN, R.; CHANG, S.; GUANCHE, D.; BALBÍN, A.; ZAYAS, J.; GARCÍA, P. Application of Ozone Therapy in Patients with Knee Osteoarthritis. **Ozone: Science & Engineering**, v. 34, n. 6, p. 469–475, nov. 2012.

CAMELIA, C.; MADALINA, I.; TATIANA, M.; MARILENA, P.; OANA, A.; SANATORIUM, B.; MARIU, V.; SOUTH, E. The role of ozone therapy in maintaining the

articular function and in relieving the pain for patients with knee osteoarthritis. **ARS Medica Tomitana**, v. 1, n. 76, p. 25–29, 2014.

CASE, P. D.; BIRD, P. S.; KAHLER, W. A.; GEORGE, R., & WALSH, L. J. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **Journal of Endodontics**, 38(4), 523–526, 2012  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.12.020>.

CASEY, R. A. Clinical problems associated with the intensive management of performance horses. In: **The welfare of horses**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 19-44.

CARDELLI, R.; SANTIS, F. D. E.; DALL'OLIO, M.; LEONARDI, M. Osteoarthritis of the Hip Treated by Intra-Articular Infiltration of Oxygen-Ozone and Hyaluronic Acid (Hyalubrix). **International Journal of Ozone Therapy**, v. 7, p. 66–69, 2008.

CHANG, J. D. S.; LU, H.-S.; CHANG, Y.-F.; WANG, D. Ameliorative effect of ozone on cytokine production in mice injected with human rheumatoid arthritis synovial fibroblast cells. **Rheumatology international**, v. 26, n. 2, p. 142–51, 2005.

DALLA COSTA, E.; MINERO, M.; LEBELT, D.; STUCKE, D.; CANALI, E.; LEACH, M. C. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. **PLoS ONE** 9(3): e92281, 2014.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092281>

GALIE, M., COSTANZO, M., NODARI, A., BOSCHI, F., CALDERAN, L., MANNUCCI, S., COVI, V., TABARACCI, G., MALATESTA, M. Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf2 dependent pathway. **Free Radical Biology and Medicine** 124, 114–121, 2018.

GLEERUP, K.B.; LINDEGAARD, C. Recognition and quantification of pain in horses: A tutorial review. **Equine Veterinary Education**, 28: 47-57, 2016. <https://doi.org/10.1111/eve.12383>, 2016.

HADDAD, M. A; SOUZA, M. V.; HINCAPIE, J. J.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; VARGAS, V. M. I. Behavior of hematological variables in horses treated with ozone therapy. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, vol. 10, núm. 7, pp. 1-12, julho, 2009a.

HADDAD, M. A.; SOUZA, M. V.; HINCAPIE, J. J.; RIBEIRO, J. I.; RIBEIRO FILHO, J. D.; BENJAMIN, L. A. Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 539–546, 2009b.

ISCO3 (Comitê Científico Internacional de Ozonioterapia) **Declaração de Madri sobre Ozonoterapia**, 2020. 3 rd ed. Madrid. Disponível em: [www.isco3.org](http://www.isco3.org). Acesso em: 10 out. 2023.

JANI, P.; PATEL, G.; YADAV, P.; SANT, L.; JAIN, H. Ozone therapy: the alternative medicine of future. **Indian Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 2, n. 4, p. 196–203, 2012.

JARAMILLO, F. M.; VENDRUSCOLO, C. P.; FULBER, J.; SEIDE, S. R. T.; BARBOSA, A. P.; BACCARIN, R. Y. A. Effects of trans-rectal medicinal ozone in horses – clinical and laboratory aspects. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, n.1, p.56-64, 2020.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; DELGADO-ROCHE, L.; DÍAZ-BATISTA, A.; PÉREZ-DAVISON, G.; RE, L. Effects of ozone therapy on haemostatic and oxidative stress index in coronary artery disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n. 1–3, p. 156–62, 15. 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>. Acesso em: 16 dez. 2023.

MCBRIDE, S. D.; MILLS, D. S. Psychological factors affecting equine performance. **BMC veterinary Research**. 2012.

OGATA, A.; NAGAHATA, H. Intra-mammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 7, p. 681– 686, 2000.

PICCIONE, G.; GIANNETTO, G.; FAZIO, F.; DI MAURO, S.; CAOLA, G. Haematological response to different workload in jumper horses. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 10, n. 1, p. 21-28, 2007.

PO, E.; WILLIAMS, C.; MUSCATELLO, G. AND CELI, P. Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of Thoroughbred foals. **Veterinary Journal**. 196: 269– 271, 2013.

SAGAI, M.; BOCCI, V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? **Medical Gas Research**, v. 1, n. 1, p. 29, 2011.

SATUÉ, K.; MUÑOZ, A.; GARDÓN, J.C. Interpretation of Alterations in the Horse Erythrogram. **Journal of Hematology Research**. 1, 000-000 1 © 2013 Savvy Science Publisher, 2013.

SCIORSI, R.L.; LILLO, E.; OCCHIOGROSSO, L.; RIZZO, A. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 240-246, 2020.

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994-1002, 2010.

SINISCALCO, D.; TROTTA, M.C.; BRIGIDA, A.L.; MAISTO, R.; LUONGO, M.; FERRARACCIO, F.; D'AMICO, M.; DI FILIPPO, C. Intraperitoneal administration of oxygen/ozone to rats reduces the pancreatic damage induced by streptozotocin. **Biology (Basel)** 7, 1–13, 2018.

SEYAM, O.; SMITH N.L.; REID, I.; GANDHI, J.; JIANG, W.; KHAN, S. A. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. **Medical Gas Research**. 2018;8(3):103-110

SMITH, N.L.; WILSON, A.L.; GANDHI, J.; VATSIA, S.; KHAN, S.A. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**. 7, 212–219, 2017.

SCHWARTZ, A.; SÁNCHEZ, G. M. Ozone therapy and its scientific foundations. **Ozone Therapy Global Journal**, v. 2, n. 1, p. 199-232, 2012.

TORCIVIA C., MCDONNELL S. Equine discomfort ethogram. **Animals**.v. 11, n. 2, p.:580, 2021.

TSUZUKI, N.; ENDO, Y.; KIKKAWA, L.; KOROSUE, K.; KANEKO, Y; KITAUCHIA, T. S. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 77: 1647-1650.doi: 10.1292/jvms.15-0225, 2015.

TRILK, J.L., LINDNER, A.J., GREENE, H.M., ALBERGHINA, D. and WICKLER, S.J., A lactate-guided conditioning programme to improve endurance performance. **Equine Veterinary Journal**, 34: 122-125, 2002.

VENDRUSCOLO, C. D. P.; MOREIRA, J. J.; SEIDEL, S. R. T.; FULBER, J.; NEUENSCHWANDER, H. M; BONAGURA, G.; AGRESTE, F. R.; BACCARIN, R. Y. A. Effects of medical ozone upon healthy equine joints: Clinical and laboratorial aspects. **PLoS ONE** 13(5): e0197736. 2018. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0197736](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197736)

VIEBAHN-HANSLER, R.; LEON FERNANDEZ, O. S.; FAHMY, Z. Ozone in medicine: the low dose ozone concept—Guidelines and treatment strategies. **Ozone: Science & Engineering**.**The Journal of the International Ozone Association**. Volume 34, 2012.



## APÊNDICES

### *Apêndice 1: análises estatísticas dos dados de hemograma e bioquímicos*

Modelo de efeitos mistos: HEMOGLOBINA versus Animal;  
Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	5.55	0.012
SEXO	1	10	0.57	0.466
Tratamento*SEXO	2	20	1.98	0.165

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
1.33319	51.62%	43.55%	128.77	131.13

Modelo de efeitos mistos: AST versus Animal; Tratamento;  
SEXO

Termo	GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	20.49	<0,001
SEXO	1	10	0.11	0.747
Tratamento*SEXO	2	20	0.55	0.584

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
69.3321	71.28%	66.49%	368.62	370.97

Modelo de efeitos mistos: CHGM (%) versus Animal; Tratamento;  
SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	16,01	<0,001
SEXO	1	10	0,06	0,818
Tratamento*SEXO	2	20	2,47	0,11

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
0,364539	76,18%	72,20%	61,48	63,84

Modelo de efeitos mistos: GGT versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	0,35	0,71
SEXO	1	10	0,07	0,795
Tratamento*SEXO	2	20	0,23	0,797

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
2,91844	51,10%	42,94%	182,21	184,57

Modelo de efeitos mistos: LogCK versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	0,42	0,662
SEXO	1	10	2,21	0,168
Tratamento*SEXO	2	20	0,67	0,523
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
0,140836	64,04%	58,04%	2,32	4,68

Modelo de efeitos mistos: LDH versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	0,37	0,695
SEXO	1	10	1,96	0,191
Tratamento*SEXO	2	20	0,40	0,674
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
188,456	37,50%	27,08%	427,05	429,41

Modelo de efeitos mistos: FIBRINOGENIO versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	3,18	0,063
SEXO	1	10	2,11	0,177
Tratamento*SEXO	2	20	0,45	0,641
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
98,8826	40,13%	30,15%	387,4	389,76

Modelo de efeitos mistos: VG (%) versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	2,56	0,103
SEXO	1	10	0,16	0,696
Tratamento*SEXO	2	20	1,6	0,227
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
3,10588	80,96%	77,79%	197,32	199,67

Modelo de efeitos mistos: HEMÁCIAS versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	2,69	0,092
SEXO	1	10	0,52	0,489
Tratamento*SEXO	2	20	1,39	0,272

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
0,636222	83,32%	80,54%	103,44	105,8

Modelo de efeitos mistos: LINFÓCITOS (ABSOLUTOS) versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	19,2	0,19	0,826
SEXO	1	10,21	1,53	0,244
Tratamento*SEXO	2	19,2	0,69	0,514

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
723,21	89,36%	87,53%	513,06	515,33

Modelo de efeitos mistos: LINFÓCITOS (RELATIVO) versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	1,01	0,383
SEXO	1	10	0,03	0,872
Tratamento*SEXO	2	20	1,26	0,305

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
9,01727	58,35%	51,41%	251,1	253,46

Modelo de efeitos mistos: MONÓCITOS (ABSOLUTOS) versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	0,74	0,484
SEXO	1	10	1,82	0,188
Tratamento*SEXO	2	20	0,17	0,841

Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
325,311	11,29%	0,00%	440,31	442,59

Modelo de efeitos mistos: MONÓCITOS(RELATIVOS) versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	1,7	0,2
SEXO	1	10	0,01	0,914
Tratamento*SEXO	2	20	1,03	0,37
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
2,64435	11,72%	0,00%	166,37	168,73

Modelo de efeitos mistos: EOSINÓFILOS (ABSOLUTO) versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	0,24	0,785
SEXO	1	10	0,85	0,379
Tratamento*SEXO	2	20	0,17	0,848
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
139,138	55,86%	48,51%	414,85	417,21

Modelo de efeitos mistos: EOSINÓFILO (RELATIVO) versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	0,41	0,671
SEXO	1	10	0,11	0,746
Tratamento*SEXO	2	20	0,06	0,944
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
1,38243	60,21%	53,57%	140,08	142,44

Modelo de efeitos mistos: BASÓFILOS (RELATIVO) versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	20	2,88	0,077
SEXO	1	10	1,28	0,269
Tratamento*SEXO	2	20	2,84	0,079
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
0,597903	47,94%	36,62%	63,15	64,82

Modelo de efeitos mistos: PLAQUETAS versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	19,81	1,01	0,383
SEXO	1	10,98	0,17	0,691
Tratamento*SEXO	2	19,81	0,64	0,536
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
61229,7	27,28%	14,30%	720,68	722,86

Modelo de efeitos mistos: LogPPT versus Animal; Tratamento; SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Tratamento	2	18,98	2,24	0,134
SEXO	1	9,98	2,95	0,117
Tratamento*SEXO	2	18,98	1,28	0,301
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
0,013043	85,62%	83,14%	-125,38	-123,1

*Apêndice 2: análises estatísticas dos dados comportamentais*

Modelo de efeitos mistos: Escore total de dor versus Animal, Fase, SEXO, Dia

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Fase	1	90	3,05	0,084
SEXO	1	10	2,9	0,119
Dia	4	90	0,38	0,821
Fase*SEXO	1	90	0,08	0,777
Fase*Dia	4	90	0,6	0,667
SEXO*Dia	4	90	0,73	0,573
Fase*SEXO*Dia	4	90	0,31	0,871
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
2,59339	47,94%	38,05%	569,47	574,56

Modelo de efeitos mistos: Escore total de dor versus Animal, Fase

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Fase	1	107	5,2	0,025

## Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
2,48165	43,63%	43,15%	584,92	590,36

## Modelo de efeitos mistos: Escore total de dor versus Animal, SEXO

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
SEXO	1	10	2,9	0,119

## Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
2,52946	40,81%	40,31%	585,17	590,61

## Modelo de efeitos mistos: Escore total de dor versus Animal, Dia

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Dia	4	104	0,35	0,845

## Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
2,56055	41,59%	39,56%	587	592,38

## Modelo de efeitos mistos: FR versus Animal; Fase experimental; SEXO; Dia Tratamento

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Fase experimental	1	90	0,27	0,603
SEXO	1	10	0,84	0,38
Dia Tratamento	4	90	0,94	0,443
Fase experimental*SEXO	1	90	0,05	0,83
Fase experimental*Dia Tratamento	4	90	0,31	0,871
SEXO*Dia Tratamento	4	90	1,34	0,262
Fase experimental*SEXO*Dia Tratamento	4	90	0,54	0,71

## Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
3,43432	37,62%	25,77%	621,81	626,9

## Modelo de efeitos mistos: FC versus Animal; Fase experimental; SEXO; Dia Tratamento

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Fase experimental	1	90	0,25	0,617
SEXO	1	10	0	1
Dia Tratamento	4	90	0,96	0,434
Fase experimental*SEXO	1	90	0,25	0,617
Fase experimental*Dia Tratamento	4	90	0,05	0,995
SEXO*Dia Tratamento	4	90	0,88	0,477
Fase experimental*SEXO*Dia Tratamento	4	90	0,24	0,917
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
3,7847	21,16%	6,18%	633,87	638,96

Modelo de efeitos mistos: FR versus Animal, Fase

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Fase	1	107	0,23	0,632
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
3,41861	26,66%	26,04%	653,53	658,96

Modelo de efeitos mistos: FC versus Animal, Fase

Termo	Num GL	Den GL	Valor F	Valor-P
Fase	1	107	0,79	0,375
Sumário do Modelo				
S	R2	R2(aj)	AICc	BIC
3,68832	11,15%	10,39%	662,91	668,35