

MELISSA ALVARENGA HADDAD

**EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SOBRE PARÂMETROS CLÍNICOS,
HEMATOLÓGICOS E DA BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA EM EQÜINOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do Título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

MELISSA ALVARENGA HADDAD

**EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SOBRE PARÂMETROS CLÍNICOS,
HEMATOLÓGICOS E DA BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA EM EQÜINOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do Título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 01 de dezembro de 2006.

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
(Co-orientador)

Prof. José Dantas Ribeiro Filho
(Co-orientador)

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vitoria

Prof. José Ivo Ribeiro Júnior

Prof^a. Maria Verônica de Souza
(Orientadora)

Conhecer aos outros é sabedoria;
Conhecer-se a si mesmo é iluminação;
O domínio dos outros requer força;
O domínio de si mesmo requer fortaleza.

Aquele que sabe que tem suficiente é rico.
Perseverança é um sinal de querer poder.
Aquele que fica resiste.

Morrer, porém não apodrecer é estar presente eternamente.

Lao Tsu

Se a medicina é moderna ou antiga não é o que interessa,
e sim, si esta cura.

Jen-Hsu Lín

A minha família pelo verdadeiro apoio a todo momento, tanto pessoal como profissional, sobretudo à enorme e infinita paciência e fortaleza da minha mãe Inês Maria; ao sentido de união dos meus irmãos Rigoberto G. e Mauricio e da minha cunhada Carolina, que os levaram a superar inúmeras dificuldades; e que a minha busca para um futuro melhor sirva de exemplo para os meus sobrinhos Rigoberto Andrés, Diego Antonio e Crista Maria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada dia, por mais uma oportunidade, e pela fortaleza e luz que me possibilitaram superar as dificuldades encontradas a cada dia.

À Prof^a. Maria Verônica de Souza, por sua imediata aceitação em me orientar, pelo ensinamento profissional e de vida, por me mostrar o essencial sentido da eficiência, pelo carinhoso acolhimento, conselhos, fortaleza e firmeza naqueles momentos que mais precisei; por estender a sua mão amiga e, muitas vezes, a proteção de mãe. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar a cada dia com o próprio exemplo. O sucesso dos projetos depende da mão de todos os integrantes da equipe!

À Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vitoria, por me escutar em várias ocasiões, por todos os momentos de conselho, pelo incentivo, por me receber como uma filha no seu lar e me permitir cuidar de suas mascotes.

Aos meus Co-Orientadores, os Professores José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamin, pelo apoio e constante disponibilidade para colaborar neste trabalho.

Ao Prof^o. José Ivo Ribeiro Júnior, pelo tempo a mim dedicado e paciência em responder aos meus questionamentos.

À senhora Rosinéia Aparecida da Cunha, pela paciência e colaboração, sempre que lhe procurei.

Aos Professores do DVT, Andréa Pacheco Batista Borges, José Antônio Viana, Cláudio César Fonseca, Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo, Luiz Gonzaga Pompermayer, Marco Túlio David das Neves (*in memoriam*), Ricardo Junqueira del Carlo e Paulo Renato dos Santos Costa, os quais tive oportunidade de reencontrar, de dar-lhes um abraço e voltar a compartilhar uma sala de aula.

Aos funcionários do DVT (Adão, Cláudio, Celinho, Cláudio, José de Oliveira, Maninha e Sidney) que, apesar de não havermos compartilhado muito tempo, sempre me receberam com um sorriso e com uma mão amiga.

À Universidade Federal de Viçosa, por mais um título.

Ao Departamento de Veterinária, por me abraçar uma segunda vez.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Escuela Agrícola Panamericana, minha primeira *Alma Mater*, por me permitir executar a parte experimental deste trabalho e pelo ensinamento de vida: *Labor Omnia Vincit*.

Ao Clube Hípico de Zamorano, pela disponibilidade dos eqüinos e das instalações para a realização desta pesquisa.

Ao Dr. John Jairo Hincapié, pela confiança e incentivo no desenvolvimento desta pesquisa, pela supervisão na parte experimental, motivação e tranqüilidade permanentemente transmitida, por me estender sempre uma mão amiga e por me inspirar sobre a nobreza da nossa profissão e da qualidade de trabalho na mesma.

Ao senhor Gerardo Benavides, pelo apoio, companhia, paciência e verdadeira dedicação, sem horários, durante a execução do trabalho de campo.

Ao senhor Emilio Chavarria, pela sua colaboração na execução do experimento.

Àquelas pessoas do corpo administrativo do Departamento de Ciência e Produção da Escuela Agrícola Panamericana, que me apoiaram, inclusive fora do horário de expediente.

À Clínica Veterinários de Eqüinos, por me abrir as portas, possibilitando a realização de parte dos exames laboratoriais.

À Dr^a. Diana Mercedes Echeverria, por sua orientação profissional, apoio, amizade e pelas árduas horas de trabalho que compartilhamos durante a fase experimental.

Ao Laboratório Molina, por permitir a realização de parte das análises laboratoriais.

À Dr^a. Maria Antonieta Molina e a sua equipe de trabalho, (virgula) pelo ânimo, incentivo e dedicação a esta pesquisa.

Aos meus amigos e irmãos, Carlos Espinoza, José Oscar Murillo, Maria Yumbla e Miriam Comis, que me acompanharam, ouviram e tiveram paciência neste difícil, mas gratificante andar.

Um especial agradecimento e reconhecimento à minha amiga, minha irmã, Jessie Galo, pela sua ajuda e apoio incondicional no momento menos esperado.

Aos meus amigos, que apesar da distância ou tempo, sempre permaneceram por perto: Alejandra Sierra, Diana Osorto, Eduardo Alencar, Elena Toro, Frederico Paes, Gina Canales, Jessie Inestroza, Kátia Atoji, Maria del Pilar Paz, Maria E.

Fernández, Neila Ribeiro, Onofre de la Cruz Verdu Arnaldos, Sandra Enríquez e Yessenia Hernández.

A todas aquelas pessoas que me ajudaram em casa, durante a minha ausência, um infinito agradecimento por cuidar do ser que me trouxe à vida.

Aos eqüinos... meu profundo respeito e agradecimento por me inspirar e ajudar a conciliar o entendimento que a compaixão pode trazer, além de uma resposta diferente e surpreendente no paciente. Uma integração inesquecível!

BIOGRAFIA

Melissa Alvarenga Haddad, nascida em 26 de maio de 1975 na cidade de Tegucigalpa, M.D.C, em Honduras na América Central.

Formada pela Escuela Agrícola Panamericana, localizada no vale de El Zamorano, Francisco Morazán, do mesmo país, como Técnico Superior em Agronomia no ano de 1996. Logo após cursou Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, obtendo seu título de Médico Veterinário no ano de 2002.

Em seguida, foi convidada para participar do Programa de Estágios no exterior pela Escola Agrícola Panamericana, trabalhando na fazenda Town and Country Farms, na cidade de Micanopy e no Hospital de Eqüinos Peterson and Smith, na cidade de Ocala, ambos no estado da Flórida, nos Estados Unidos de Norte América.

De volta ao país de origem realizou consultorias na área de nutrição eqüina, no projeto de capacitação para fazendeiros organizados em centros de colheita e esfriamento do leite (CREL), apoiado pela Escola Agrícola Panamericana, assim como pela Secretaria de Agricultura (através do SENASA), Direção de Ciência e Tecnologia (DICTA) e pelo Banco Interamericano de Desenvolvimento (BID). Posteriormente prestou serviços à Secretaria de Agricultura, dentro da Direção do Serviço Nacional de Sanidade Agropecuária (SENASA).

Em 2005 ingressou no Programa de Pós-graduação do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, com conclusão do mestrado em dezembro de 2006.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
CAPITULO I - Considerações Gerais.	
Introdução geral.....	1
Revisão de literatura geral.....	2
Material e métodos.....	7
Animais.....	7
Sensibilização dos animais à ozonioterapia.....	8
Tratamento de manutenção.....	8
Parâmetros clínicos avaliados.....	9
Parâmetros laboratoriais avaliados.....	10
Obtenção de amostras.....	10
Técnicas utilizadas para determinação dos parâmetros laboratoriais	
Hemograma completo.....	11
Fibrinogênio.....	11
Glicose, creatina quinase (CK) e gama glutamiltransferase (GGT).....	11
Análise estatística.....	12
Referências bibliográficas.....	15
CAPITULO II - Comportamento de parâmetros hematológicos e bioquímicos sangüíneos no período de repouso durante aplicação de ozônio em eqüinos.	
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Revisão de literatura.....	21
Resultados e discussão.....	23
Conclusões.....	34
Referências bibliográficas.....	35

CAPITULO III - Monitoramento de parâmetros hematológicos e bioquímicos durante ozonioterapia em eqüinos.

Resumo.....	39
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Revisão de literatura.....	42
Resultados e discussão.....	44
Conclusões.....	81
Referências bibliográficas.....	82

CAPITULO IV – Ozonioterapia em eqüinos: efeitos principais e da interação do sexo e dose administrada sobre parâmetros hematológicos e da bioquímica sangüínea.

Resumo.....	88
Abstract.....	89
Introdução.....	90
Revisão de literatura.....	91
Resultados e discussão.....	92
Conclusões.....	108
Referências bibliográficas.....	109

CAPITULO V - Comportamento, monitoramento e efeitos da ozonioterapia sobre a freqüência cardíaca e respiratória de eqüinos no período de recuperação.

Resumo.....	113
Abstract.....	114
Introdução.....	115
Revisão de literatura.....	116
Resultados e discussão.....	118
Conclusões.....	134
Referências bibliográficas.....	135

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

TABELA 1 - Estimativas dos parâmetros de hematócrito (%), hemoglobina (g dL^{-1}), eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) e leucócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), em função do tempo de repouso (H) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.....25

TABELA 2 - Estimativas dos parâmetros de segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) e linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), em função do tempo de repouso (H) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.....27

TABELA 3 - Estimativas dos parâmetros de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) e basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), em função do tempo de repouso (H) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.....28

TABELA 4 - Estimativas dos parâmetros de plaquetas (por campo) e glicose (mg dL^{-1}), em função do tempo de repouso (H) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.29

TABELA 5 - Estimativas dos parâmetros de fibrinogênio (mg dL^{-1}), creatina quinase (U L^{-1}) e gama glutamiltransferase (U L^{-1}), em função do tempo de repouso (H) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.....32

CAPITULO III

TABELA 1 – Valores mínimos, máximos e médios do hematócrito (%) em equinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....46

TABELA 2 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de hemoglobina (g dL ⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	48
TABELA 3 – Valores mínimos, máximos e médios dos eritrócitos (x10 ⁶ µL ⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	50
TABELA 4 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de leucócitos (x10 ³ µL ⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	52
TABELA 5 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de segmentados (x10 ³ µL ⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	55
TABELA 6 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de bastonetes (x10 ³ µL ⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	58
TABELA 7 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de linfócitos (x10 ³ µL ⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	60
TABELA 8 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de monócitos (x10 ³ µL ⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	63
TABELA 9 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de basófilos (x10 ³ µL ⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	65

TABELA 10 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	67
TABELA 11 – Valores mínimos, máximos e médios de plaquetas (por campo) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	69
TABELA 12 – Valores mínimos, máximos e médios de glicose (mg dL^{-1}) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	72
TABELA 13 – Valores mínimos, máximos e médios de fibrinogênio (mg dL^{-1}) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	74
TABELA 14 – Valores mínimos, máximos e médios de creatina quinase (U L^{-1}) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	76
TABELA 15 – Valores mínimos, máximos e médios da gama glutamiltransferase (U L^{-1}) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).....	78
CAPITULO IV	
TABELA 1 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre o hematócrito (%) em cada período de aplicação.....	93
TABELA 2 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre a hemoglobina (g dL^{-1}) em cada período de aplicação.....	95

TABELA 3 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.....	96
TABELA 4 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os leucócitos totais ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.....	97
TABELA 5 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.....	98
TABELA 6 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.....	99
TABELA 7 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.....	100
TABELA 8 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.....	101
TABELA 9 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.....	102
TABELA 10 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.....	102

TABELA 11 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre as plaquetas (por campo) em cada período de aplicação.....103

TABELA 12 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre a creatina quinase ($U L^{-1}$) em cada período de aplicação.....103

TABELA 13 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre a gama glutamiltransferase ($U L^{-1}$) em cada período de aplicação.....104

TABELA 14 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre a glicose ($mg dL^{-1}$) em cada período de aplicação.....105

TABELA 15 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre o fibrinogênio ($mg dL^{-1}$) em cada período de aplicação.....106

CAPITULO V

TABELA 1 - Estimativas dos parâmetros frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) em função do tempo de recuperação (T) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.....120

TABELA 2 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência cardíaca (bpm) antes da aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.....128

TABELA 3 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência cardíaca (bpm) até 10 minutos após a aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.....129

TABELA 4 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência cardíaca (bpm) até 20 minutos da aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.....	131
TABELA 5 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência respiratória (rpm) antes da aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.....	131
TABELA 6 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência respiratória (rpm) até 10 minutos após a aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.....	132
TABELA 7 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência respiratória (rpm) até 20 minutos após a aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.....	133

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO III

- FIGURA 1 – Estimativas do hematócrito (%) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....47
- FIGURA 2 – Estimativas da hemoglobina (g dL^{-1}) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....49
- FIGURA 3 – Estimativas de eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....51
- FIGURA 4 – Estimativas de leucócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....53

FIGURA 5 – Estimativas de segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....	56
FIGURA 6 – Estimativas de bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....	59
FIGURA 7 – Estimativas de linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....	61
FIGURA 8 – Linfócito com granulações azurófilas detectado durante o período de aplicação do ozônio.....	61
FIGURA 9 – Estimativas da frequência de linfócitos com granulações azurófilas (%) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação do ozônio.....	62

- FIGURA 10 – Estimativas de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....64
- FIGURA 11 – Estimativas de basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....66
- FIGURA 12 – Estimativas de eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....68
- FIGURA 13 – Estimativas de plaquetas (/por campo) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....70
- FIGURA 14 – Estimativas de glicose (mg dL^{-1}) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....73

FIGURA 15 – Estimativas de fibrinogênio (mg dL^{-1}) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....75

FIGURA 16 – Estimativas de creatina quinase (U L^{-1}) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações 1-9).....77

FIGURA 17 – Estimativas de gama glutamiltransferase (U L^{-1}) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle. (Aplicações de 1-9).....79

CAPITULO V

FIGURA 1 – Estimativas da frequência cardíaca (bpm) imediatamente antes de cada aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.....121

FIGURA 2 – Estimativas da frequência cardíaca (bpm) até 10 minutos depois da administração do ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.....122

FIGURA 3 – Estimativas da frequência cardíaca (bpm) até 20 minutos depois da administração de ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.....123

FIGURA 4 – Estimativas da frequência respiratória (rpm) imediatamente antes da administração do ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.....124

FIGURA 5 – Estimativas da frequência respiratória (rpm) até 10 minutos depois da administração de ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.....125

FIGURA 6 – Estimativas da frequência respiratória (rpm) até 20 minutos depois da administração do ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.....126

RESUMO

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Efeitos da ozonioterapia sobre parâmetros clínicos, hematológicos e da bioquímica sangüínea em eqüinos**. Orientadora: Maria Verônica de Souza, Co-Orientadores: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

O objetivo deste estudo foi avaliar em eqüinos submetidos a ozonioterapia, os parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (glicose, fibrinogênio, creatina quinase e gama glutamiltransferase), segundo o comportamento imediato (até 24 horas) entre aplicações da mistura do gás (período de repouso), assim como as tendências, positivas e/ou negativas durante o período de aplicação do ozônio e a influência da dose, sexo ou interação destes fatores nestes parâmetros. Também foram monitorados o comportamento, tendências e efeitos do ozônio sobre parâmetros fisiológicos, como frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) durante o período de recuperação (até 20 minutos após a ozonioterapia). Para isso, foram utilizados 12 eqüinos mestiços saudáveis, sendo 6 machos e 6 fêmeas, com idades compreendidas entre 4 e 20 anos. Os animais foram submetidos à ozonioterapia, mediante administração de 500 ou 1000 mL da mistura do gás, por via intravenosa, a cada três dias, por um período total de 24 dias. Os animais foram divididos em quatro grupos: MT500, MT1000, FT500 e FT1000, sendo machos (M) que receberam 500 mL e 1000 mL e, fêmeas (F) que receberam 500 e 1000 mL, respectivamente. Os diferentes efeitos do ozônio sobre os parâmetros hematológicos e da bioquímica sangüínea foram inicialmente estudados durante o período de repouso (1, 6 e 24 horas após cada aplicação de ozônio), e para as frequências cardíaca e respiratória, esta avaliação imediata foi durante o período de recuperação (até 20 minutos após cada aplicação de ozônio). Além disso, os parâmetros foram avaliados ao longo do tempo do período experimental. Os resultados demonstraram que os únicos parâmetros que sofreram efeito linear durante o período de repouso foram a contagem total de plaquetas e a concentração de glicose e de gama glutamiltransferase, que revelaram concentração aumentada (plaquetas) ou diminuída (glicose e gama glutamiltransferase). Foram observadas tendências positivas após ozonioterapia, mediante aumento nos valores do hematócrito e

eritrócitos, sendo que, com relação aos últimos, as fêmeas mostraram médias superiores. Também ocorreu aumento na concentração dos segmentados, ainda que de forma tardia. Adicionalmente, foi possível verificar aumento transitório nos valores dos bastonetes, assim como comprovar o aumento na contagem das plaquetas e o efeito hipoglicemiante em todos os eqüinos. Com relação às enzimas, somente a gama glutamiltransferase apresentou uma elevação inicial bastante evidente, com posterior redução em todos os grupos. Com relação ao sexo, os resultados demonstraram que este foi um fator de relevância na concentração dos eritrócitos ($p < 0,05$) em resposta à ozonioterapia, sendo que as fêmeas revelaram valores médios mais altos deste parâmetro, independentemente da dose do ozônio administrada. Por fim, com relação aos parâmetros frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR), observou-se aumento na FC ($p > 0,05$) e FR ($p < 0,05$) em todos os eqüinos expostos ao ozônio, independente do sexo, dose ou da interação destes fatores. Transcorridos o período de recuperação (até 20 minutos posteriores à ozonioterapia), os valores médios desses parâmetros diminuíram, sendo um indício de que a terapia auxilia no condicionamento cárdio-respiratório dos eqüinos. Efeitos adversos não foram observados nos animais em decorrência da administração do ozônio pela via intravenosa durante o período experimental.

ABSTRACT

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2006. **Effects of ozone therapy on equine clinical, hematological and blood biochemistry parameters.** Adviser: Maria Verônica de Souza, Co-Advisers: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

The purpose for this study was to evaluate equine hematological (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, neutrophils, bands, lymphocytes, monocytes, basophils, eosinophils and platelets) and biochemical parameters (glucose, fibrinogen, creatine kinase and gamma glutamyltransferase) submitted to ozone therapy, in behalf of the immediate response pattern (the following 24 hours) in between the gas mixture applications (resting period), as well as the positive and/or negative tendencies during the application period and the dose and sex influence or the interaction of these factors on the parameters. Moreover, pattern, tendency and effects of ozone therapy over heart (HR) and respiratory (RR) rates during the recovery period (up to 20 minutes after ozone therapy) were monitored. Twelve cross bred horses, 6 males and 6 females, between 4 and 20 years old were exposed to ozone therapy through the intravenous application of 500 and 1000 mL of the gas mixture, every three days, during 24 days. Four groups were conformed: MT500, MT1000, FT500 and FT1000, which comprised males (M) and females (F) receiving 500 and 1000 mL of ozone, respectively. The different ozone effects over the hematological and blood biochemistry parameters were at first studied during the resting period (1, 6 and 24 hours after each ozone application) and for heart and respiratory rates this immediate evaluation was during the recovery period (until 20 minutes after each ozone application). Furthermore, the parameters were assessed during the experimental time. The results revealed that only the platelets count and glucose and gamma glutamyltransferase concentrations, revealed a linear pattern in response to ozone therapy during the resting period. The former was increased (platelets) and the others diminished (glucose and gamma glutamyltransferase). Positive tendencies were observed after ozone therapy through the hematocrit and erythrocytes values increase, the later count was greater within the mares. Also an augment was registered on neutrophils count even though in a later phase. Furthermore, a transient augment in bands count, platelets and a hypoglycemic effect within each experimental group was

seen. Only gamma glutamyltransferase showed an evident initial increase with a later decrease in each group. According to sex, the results revealed that this was a relevant factor on the erythrocytes blood count ($p < 0.05$) in response to ozone therapy, where the females showed higher mean values of this parameter, independently of the administered dose. Finally, related to the heart rate (HR) and respiratory frequency (RF), the results revealed an increase in HR ($p > 0.05$) and RF ($p < 0.05$) in all horses exposed to ozone, independent on sex, dose or the interaction between these factors. After the recovery period (until 20 minutes after ozone therapy), the HR and RR mean values decreased, fact that could imply preconditioning on the horses cardiorespiratory performance. Adverse effects induced by ozone were not observed in the animals through the intravenous application during the experimental period.

CAPITULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO GERAL

Desde os mais remotos tempos, têm-se buscado formas alternativas de tratamento com terapias economicamente viáveis e eficientes. Entre estas formas relata-se a ozonoterapia, que é uma forma de tratamento que utiliza uma mistura de oxigênio-ozônio (O_2-O_3), mediante a passagem de oxigênio puro por uma descarga elétrica de alta voltagem e alta frequência. Este tratamento é realizado por um equipamento de eletromedicina, que produz um gás com distintas concentrações de ozônio.

Após penetrar no organismo, o ozônio é capaz de melhorar a oxigenação e, conseqüentemente, o metabolismo, o que contribui para a eliminação de produtos tóxicos gerados pelo catabolismo celular e para a regulação dos mecanismos de defesa imunológica, inclusive com efeito imunomodulador (Recio del Pino *et al.*, 1999).

O poder oxigenante do ozônio é superior ao do oxigênio, uma vez que estimula diferentes sistemas enzimáticos protetores do organismo (Díaz *et al.*, 2001). Mais especificamente no sangue, melhora a circulação sangüínea através dos capilares, mediante discreto aumento da pressão arterial, assim como das propriedades reológicas do sangue, aumentando a capacidade de distribuição e absorção do oxigênio nos eritrócitos (Pérez *et al.*, 2003). Como resultado, ocorre uma notável melhora na microcirculação e, conseqüentemente, do oxigênio para os tecidos, intensificando a regeneração (Hernández & González, 2001) e cicatrização tecidual (Recio del Pino *et al.*, 1999). Adicionalmente, possui ação bactericida, fungicida e viricida (Guerra *et al.*, 1999); reduz a agregação plaquetária, além de atuar como antiálgico, antiinflamatório e estimulante do sistema reticuloendotelial (Hernández & González, 2001).

O presente estudo visou a verificação de mudanças (positivas ou negativas) em parâmetros sob avaliação, mediante a aplicação do ozônio (O_2-O_3) em equinos clinicamente sadios, com a finalidade de se obter uma maior inserção da ozonioterapia em protocolos da prática veterinária.

REVISÃO DE LITERATURA GERAL

O ozônio, que em grego significa “cheiroso”, foi descoberto em 1840 por Christian Frederick Schönbein, ao submeter o oxigênio a uma descarga elétrica (Hernández & González, 2001). Porém, o primeiro relato da sua utilização em medicina humana ocorreu durante a primeira guerra mundial, quando o Dr. Albert Wolf utilizou o gás no tratamento tópico para desinfecção de feridas e na potabilização da água.

O ozônio, composto por três átomos de oxigênio, tende a se degradar rapidamente devido ao seu forte poder oxidativo (Recio del Pino *et al.*, 1999), não resultando em resíduos tóxicos, já que ao entrar no organismo, se converte instantaneamente em oxigênio (González *et al.*, 1999). Sendo assim, a ozonioterapia atua melhorando os parâmetros reológicos e a circulação sanguínea, por aumentar a elasticidade da hemácia, favorecendo a chegada do oxigênio nos tecidos (Pérez *et al.*, 2003). Ao reagir com ácidos graxos insaturados da membrana, o ozônio origina peróxidos hidrófilos que estimulam a formação de compostos desoxigenantes, que agem sobre a oxihemoglobina, para liberar o oxigênio, aumentando assim a distribuição deste nos tecidos (Hernández & González, 2001).

A melhora na perfusão dos tecidos danificados permite a chegada de componentes humorais, o que auxilia no controle da inflamação. O ozônio tem afinidades com o grupo sulfidril, que é característico dos aminoácidos essenciais como a cisteína e a metionina, o que lhe permite intervir no metabolismo das proteínas (Pérez *et al.*, 2003), contribuindo assim para a produção de citocinas, síntese de anticorpos e ativação dos linfócitos T, o que melhora significativamente a oxigenação e o metabolismo celular por meio da vasodilatação (Clive *et al.*, 2004). Também aumenta a resposta enzimática antioxidativa (Guerra *et al.*, 1999; Clive *et al.*, 2004), o que lhe confere um papel imunorregulador.

O ozônio também age sobre o mecanismo hemostático, por meio da inibição no aumento de cálcio plasmático induzido pelo colágeno e trombina, o que pode resultar na inibição da agregação plaquetária (Díaz *et al.*, 2001). Atua diminuindo a viscosidade do sangue e do plasma, por redução das macromoléculas plasmáticas e da capacidade de formação de coágulo, o que pode ser constatado pelo aumento no tempo de trombina (TT), fator von Willebrand (vWF) e do plasminogênio (t-PA), assim como pela diminuição do fibrinogênio (Zee & De Monte, 2001).

Adicionalmente, aumenta a fluidez da membrana do eritrócito e diminui a capacidade de aglutinação dos glóbulos vermelhos e, no interior dessas células, acelera a glicólise (Bulies, 1996).

Segundo Bulies (1996), o ozônio também age nos mecanismos de oxi-redução (NADH-NADPH), ativando a via da pentose/fosfato (via alternativa do ciclo de Krebs para a glicólise), o que incrementa a transformação da glicose.

Esse gás, que tem alto poder oxidante de forma seletiva, age sobre a camada fosfolipídica da membrana dos eritrócitos desenvolvendo uma cadeia de reações dose-dependente, que pode ser benéfica ou deletéria ao organismo (Giunta *et al.*, 2001).

Quando em contato com o sangue, provoca a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Com a formação dos ROS e radicais livres, o sistema antioxidante endógeno é ativado. Se a formação da espécie reativa supera o sistema de defesa, o organismo começa a sofrer o estresse oxidativo, com a degradação subsequente de lipídeos, proteínas e DNA, com conseqüente dano celular. Entretanto, em concentrações adequadas, o ozônio promove o processo oxidativo celular, mas de forma benéfica, já que também ativa o sistema antioxidante endógeno. Parte do gás é inibida por este mesmo sistema de defesa e o restante reage com ácidos graxos poliinsaturados, gerando peróxido de hidrogênio (molécula não ionizada) e produtos de oxidação lipídica (Tylicki *et al.*, 2003).

O aumento de peróxido de hidrogênio gera um processo celular tóxico que é transferido ao ambiente intraplasmático, onde então é neutralizado pela glutathiona reduzida (GSH), que faz parte do sistema endógeno não-enzimático de defesa contra o estresse oxidativo. Esta decresce durante a ozonioterapia, devido ao consumo celular aumentado durante o tratamento (Tylicki *et al.*, 2003).

No metabolismo celular normal, constantemente se produz energia (adenosina trifosfato -ATP), sendo o oxigênio um elemento importante para esta produção. Em casos de isquemia, este processo é interrompido, e o ATP é degradado em adenosina monofosfato (AMP) e adenosina. Esta última, extracelularmente, é metabolizada em inosina e hipoxantina. Quando a oxigenação é adequada, a hipoxantina é degradada em ácido úrico pela xantina-desidrogenase (XD). Em casos de hipoxia, a XD é convertida em xantina-oxidase (XO), tendo como resultado um acúmulo de hipoxantina. Subseqüentemente, na reperusão, a XO interfere na conversão da hipoxantina em radicais superóxidos que reagem com as membranas celulares, ocasionando lesão (Abreu, 2003).

A via xantina/xantina oxidase tem efeitos deletérios no organismo, gerando espécies reativas de oxigênio em animais com quadro de isquemia. O tratamento prévio com a ozonioterapia tem mostrado uma diminuição significativa no acúmulo de xantina e, portanto, na produção de espécies reativas de oxigênio, o que afirma o seu efeito antioxidante. Adicionalmente, estudos realizados em humanos e na espécie equina têm demonstrado redução na concentração das transaminases aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e do lactato (Scrollavezza *et al.*, 1997; Zee & De Monte, 2001).

Pela sua alta capacidade de interação com os ácidos graxos insaturados na membrana fosfolipídica (ozonólise), que leva à formação de peróxidos hidrofílicos, ocorre a detoxificação de substâncias, como por exemplo, os radicais livres (Tylicki *et al.* 2003). Além disso, devido ao fato de que processos enzimáticos não inativam o ozônio, tem-se reconhecido o seu poder bactericida, viricida e fungicida (Pérez *et al.*, 2003). Os efeitos bactericidas ocorrem pela interrupção da integridade dos fosfolipídios e lipoproteínas da membrana citoplasmática e da parede celular das bactérias (Bulies, 1996; Clive *et al.*, 2004), sendo que as Gram negativas são as mais sensíveis ao ozônio, mediante a peroxidação desses componentes de membrana. Seu efeito viricida é por causar danos na região do capsídeo, já que este é estruturado por fosfolipídios e glicoproteínas, mas a sensibilidade do vírus é muito variável. O mecanismo fungicida ainda não é muito bem compreendido; entretanto já foi demonstrado o poder inibitório do ozônio sobre estes agentes (Hernández & González, 2001).

A vida média do ozônio é de 40 minutos a 25°C. Após este tempo, se decompõe em oxigênio, dependendo da temperatura ambiental. Sendo assim, produtos ozonizados devem ser produzidos imediatamente antes da sua utilização (Bulies *et al.*, 1997). Em medicina humana, utilizam-se concentrações de ozônio-oxigênio entre 1 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Hernández & González, 2001). Em veterinária, utilizam-se as concentrações de 6, 30 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Scrollavezza *et al.*, 1997; Ogata & Nagahata, 2000; Alves *et al.*, 2004).

Na medicina humana, a ozonioterapia vem sendo utilizada em distintos tipos de tumores; em afecções inflamatórias (conjuntivite, estomatite, hepatite, pancreatite, cistite, glomerulonefrite, endometrite, epididimite, orquite, osteomielite, tendinite, espondilite anquilosante, septicemia); em feridas, eczemas, úlceras, gangrenas e psoríase; anemias; processos isquêmicos e arteriosclerose; glaucoma, diabetes; asma;

tétano; hérnia de disco lombar, mialgia, neuropatias e osteoartrite. Também tem sido utilizada nos casos de amebíase, giardíase, babesiose, bartonelose, brucelose, doença de chagas, erlichiose, coronavirose, leishmaniose, listeriose, salmonelose, toxoplasmose e, inclusive, na intoxicação alimentar (Al-Dalien *et al.*, 1999; Recio Del Pino *et al.*, 1999; Espinosa *et al.*, 2000; Piloto & Urrutia, 2000) e no choque séptico (Zamora *et al.*, 2001). A via de administração nesta espécie pode ser a intravenosa, intramuscular, subcutânea, intra-articular, assim como por insuflação vaginal e retal. Também pode ser realizada a autohemotransfusão (extração e ozonização de sangue, que posteriormente é administrado ao paciente) e o tratamento tópico (com gás ou óleo ozonificado) (Guerra *et al.*, 1999; Hernández & González, 2001).

Na medicina veterinária, ainda são poucos os relatos de afecções tratadas pela ozonioterapia. Em suínos, aves e coelhos têm-se utilizado a aplicação tópica de óleo ozonizado para acelerar a cicatrização, com uma ou duas aplicações por dia, durante uma semana (Camps *et al.*, 2003; Navil *et al.*, 2004). Em vacas leiteiras com mastite clínica aguda, a terapia tem sido utilizada por via intra-mamária, por um período de três semanas, sendo um tratamento a cada dois dias na primeira semana e, posteriormente, um único tratamento semanal (Ogata & Nagahata, 2000). Em equinos, há relatos da sua aplicação em afecções locomotoras (sinovite da bursa do osso navicular; osteoartrite da articulação interfalângiana distal; tenopatia no local de inserção do tendão do músculo flexor digital profundo) (Pastoriza, 2002), tratamento de processos isquêmicos (Alves *et al.*, 2004) e na diminuição dos efeitos negativos do metabolismo aeróbico/anaeróbico, em condições de máximo esforço em animais de corrida (Scrollavezza *et al.*, 1997), sendo neste último, utilizado um protocolo de aplicação a cada três dias. Segundo Alves *et al.* (2004), a utilização do ozônio é uma possível alternativa no tratamento de equinos acometidos por abdome agudo, já que as propriedades bioquímicas do ozônio induzem à modulação de enzimas antioxidantes, o que leva a um efeito conservador do trato gastrointestinal.

A ozonioterapia é reconhecida e aplicada em Cuba, vários países da Europa e Ásia. Alguns estados norte-americanos estão legalizando a sua utilização como terapia alternativa (Scrollavezza *et al.*, 1997; Ogata & Nagahata, 2000; Hernández & González, 2001; Di Paolo *et al.*, 2004). No Brasil, o tratamento com ozônio medicinal vem sendo realizado desde 1975, após a sua introdução pelo médico paulista Heinz Konrad. Desde o ano de 1995, a Dra. Claudia Catelani Cardoso (UNIFENAS-MG) vem utilizando a ozonioterapia na área clínica, com pesquisas avaliando as atividades

antiinflamatórias e cicatrizantes do óleo ozonizado (oleozon) e na prevenção de osteomielite. Também o Dr. Glauco de Souza Brito, do Departamento de Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo vem estudando os efeitos do gás desde 2003. Além disso, durante a I Conferência Internacional sobre o uso médico e odontológico do ozônio, realizada em Santo André/SP (17 a 19/09/04), se constituiu a Sociedade Brasileira do Ozônio.

São raros os efeitos colaterais registrados em humanos. Entretanto, o ozônio pode ser irritante e tóxico quando administrado por via respiratória, podendo ocasionar alterações na densidade do tecido pulmonar, irritação do epitélio traqueal e bronquial, além de enfisema (Di Paolo *et al.*, 2004), o que pode resultar em diminuição da resistência a agentes infecciosos.

Os sinais de intoxicação descritos na espécie humana são os seguintes: tosse, congestão nasal, irritação das vias aéreas superiores, dor na região peitoral, dificuldade ou dor ao respirar, falta de ar, dor de cabeça, fadiga, mudanças no campo visual, epífora, diminuição na frequência cardíaca e na pressão arterial. Por outro lado, todos esses efeitos dependem da dose e da exposição prolongada ao ozônio (González *et al.*, 1999). Em bovinos pode ocorrer hipoglicemia transitória¹.

Apesar das propriedades terapêuticas do ozônio em diversos sistemas, ainda são poucos os trabalhos científicos em animais domésticos. Nesse sentido, é preciso investigar melhor a ozonioterapia para que se possa implementar efetivamente a sua utilização na Medicina Veterinária.

¹ Comunicação pessoal. Dr. John Jairo Hincapié. Escuela Agrícola Panamericana , Honduras. Tel. (504)-776-6140, ext. 2216. E-mail: jhincapie@zamorano.edu

MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental da pesquisa foi realizada entre os meses de janeiro e abril de 2006, na Escuela Agrícola Panamericana (EAP), no Vale de El Zamorano, Honduras.

Os exames complementares foram realizados no Laboratório Molina e no Centro de Diagnóstico Médico Veterinário (DIMEVET) da Clínica de Veterinários de Equinos (VETEQUI), na cidade de Tegucigalpa, Honduras.

Um estudo piloto foi realizado antes do experimento propriamente dito, utilizando-se dois animais que não pertenceram ao grupo experimental, com a finalidade de se verificar o comportamento dos parâmetros que foram posteriormente avaliados nos animais durante a pesquisa.

A realização deste estudo foi aprovada pelo Conselho de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Animais

Foram utilizados doze eqüinos mestiços de Quarto de Milha com Puro Sangue Andaluz e de Quarto de Milha com Peruano, sendo seis machos e seis fêmeas, com idades compreendidas entre 4 e 20 anos (média de 11 anos). Os critérios abaixo relacionados foram utilizados para a seleção desses animais:

- a. Se mostrar clinicamente sadio durante a realização do exame físico.
- b. Apresentar parâmetros hematológicos e da bioquímica sangüínea dentro dos valores considerados como de referência para a espécie.
- c. As fêmeas não poderiam estar gestantes nem lactantes.

Após a seleção, os animais foram semi-confinados em baias abertas e anexas a um pequeno piquete, sendo alimentados com feno de capim estrela (*Cynodon nlemfuensis*) e ração (proteína: 15%, gordura mínima: 3%, umidade máxima: 13%, fibra máxima: 10% e cinzas máximas: 10%). A água foi deixada *ad libitum*.

Todos os animais foram vermifugados 30 dias antes do início do experimento.

Durante a realização da fase experimental, os animais foram levados dos piquetes anexos para as baias de confinamento para receberem a aplicação do ozônio. As baias apesar de abertas possuíam telhado, de forma que, os animais não eram

expostos ao sol, reduzindo assim, a possibilidade de alterações que levassem ao estresse térmico, além de modificações na frequência cardíaca e respiratória e nos parâmetros hematológicos e da bioquímica sanguínea que seriam avaliados no estudo.

Sensibilização dos animais à ozonioterapia

Para a sensibilização dos equinos a ozonioterapia, foram colhidos 250 mL de sangue da veia jugular, mediante a utilização de bolsas de flebotomia, contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,8%. Posteriormente, este sangue foi ozonizado com 250 mL de ozônio a uma concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, segundo a técnica utilizada por Scrollavezza *et al.* (1997). O aparelho ozonizador utilizado foi da marca Meditrónica^{®1}, sendo conectado a um tanque portátil de oxigênio de 2000 lb. Imediatamente após a ozonização do sangue *ex vivo*, realizou-se a autohemotransfusão.

Tratamento de manutenção

Após a sensibilização (tempo zero, Quadro 1), os animais foram submetidos a dois tratamentos, sendo o T500, aquele em que seis equinos, três fêmeas (F) e três machos (M), receberam por via intravenosa, uma dose crescente da mistura oxigênio-ozônio, chegando a um volume total de 500 mL de gás. No segundo tratamento (T1000), os outros seis animais (três fêmeas e três machos) também receberam uma dose crescente da mistura do gás, porém o volume máximo foi de 1000 mL (Quadro 1). Foi utilizado como veículo para aplicação do gás, 250 mL de solução salina a 0,9%. As aplicações dos tratamentos foram realizadas a cada três dias, perfazendo um total de nove aplicações por tratamento. Desta maneira foram formados quatro grupos de trabalho MT500, FT500, MT1000 e FT1000.

A dosagem final recebida pelos equinos foi de 35 e $70 \mu\text{g kg}^{-1}$ no tratamento de 500 e 1000 mL, respectivamente. A concentração da mistura de gás foi de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

¹Acupuntura de Equinos: Carretera 42 #7 A sur 92, Apto. 1203, Balsos de Oviedo, Medellín, Colombia

QUADRO 1 – Concentrações do ozônio utilizadas na sensibilização e períodos de aplicações nos eqüinos.

<i>Sensibilização (AHT)</i>		<i>Tratamento 500 mL ozônio (O₃) (T500)</i>								
Tempo (dias)	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
Ozônio (mL)	250	500	500	500	500	500	500	500	500	0
<i>Sensibilização (AHT)</i>		<i>Tratamento 1000 mL ozônio (O₃) (T1000)</i>								
Tempo (dias)	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
Ozônio (mL)	250	500	750	1000	1000	1000	1000	1000	1000	0

AHT: autohemotransfusão ozonizada.

Durante a fase experimental os animais continuaram recebendo água *ad libitum*, porém com restrição alimentar, até que fosse efetuada a coleta de sangue correspondente a uma hora (1h) após à ozonioterapia, quando então recebiam somente feno de capim estrela (*Cynodon nlemfuensis*). Este jejum alimentar teve como principal finalidade evitar coleta de amostras com valores glicêmicos alterados pela alimentação. Adicionalmente, como a chegada do alimento ao cólon ocorre em torno de três horas após a sua ingestão (Stein, 2002), aliado ao fato de que o amido pode aumentar o nível glicêmico num prazo de 2 a 3 horas, com retorno aos valores normais em seis horas (Casalecchi, 2003), a última amostragem do dia foi realizada seis horas após o acesso ao feno, sem que fosse fornecido ração ao animal.

Houve acompanhamento dos eqüinos por pelo menos dois médicos veterinários durante a fase de sensibilização e manutenção dos tratamentos, para que se pudesse intervir prontamente caso o bem-estar do animal não estivesse sendo mantido.

Parâmetros clínicos avaliados

Todos os animais foram submetidos a exame físico diário, onde foram avaliados os parâmetros frequência cardíaca (batimentos por minuto - bpm), frequência respiratória (respirações por minuto - rpm) e temperatura retal.

Além disso, como parte do exame clínico, foram avaliados o tempo de preenchimento capilar (TPC) e a coloração das mucosas e o tempo de preenchimento capilar (TPC).

Esses parâmetros foram considerados normais de acordo com as classificações descritas por Speirs (1999) para a espécie equina.

Parâmetros laboratoriais avaliados

Amostras de sangue foram colhidas para realização de hemograma (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e contagem total de plaquetas) e de plasma ou soro para a determinação dos valores dos parâmetros bioquímicos (fibrinogênio, glicose, creatina quinase - CK e gama glutamiltransferase - GGT), que se repetiu durante todo o experimento.

Os parâmetros foram analisados imediatamente antes e em três tempos (1, 6 e 24 horas) após administração do ozônio, perfazendo um total de 36 amostras por animal durante todo o período experimental. Adicionalmente, foi realizada uma medição três dias após a última administração do ozônio, perfazendo um total de 444 amostras.

Obtenção das amostras

Amostras de sangue (5 mL) foram colhidas por punção da veia jugular, em tubos de vidro a vácuo, contendo o anticoagulante EDTA tripotássico, para realização de hemograma completo.

Para a determinação da concentração da glicose, creatina quinase e gama glutamiltransferase, foram colhidos 10 mL de sangue em tubos de vidro a vácuo sem anticoagulante, também por punção da veia jugular. Essas amostras foram submetidas à sedimentação em temperatura ambiente e, posteriormente, por centrifugação a 3.500 rpm durante 10 minutos, para a obtenção do soro.

A concentração do fibrinogênio foi determinada mediante a colheita de 5 mL de sangue em tubos de vidro a vácuo contendo o anticoagulante citrato de sódio (3,8%). A amostra foi centrifugada por 10 a 15 minutos a 3.500 rpm, para a obtenção do plasma, que foi transferido para tubos de polietileno.

As amostras de sangue, soro e plasma foram mantidas sob refrigeração em recipientes térmicos contendo gelo até posterior análise, que não excedeu de um total de 10 horas.

A primeira amostragem, efetuada antes das aplicações do ozônio (0 h), durante todo o período experimental (até o 27º dia), foi realizada às 7:00 horas, quando a temperatura ambiente estava mais confortável (entre 28-32 °C).

Técnicas utilizadas para a determinação dos parâmetros laboratoriais

Hemograma completo

A contagem do número de hemácias (células x 10⁶ µL⁻¹) e leucócitos totais (células x 10³ µL⁻¹), assim como a mensuração da hemoglobina (g dL⁻¹) e hematócrito (%) foi realizada mediante a utilização do aparelho semi-automático Cell Dyn 400¹.

A contagem das plaquetas foi determinada nos esfregaços sanguíneos realizados, mediante visualização em microscópio da marca Olympus CX31².

A determinação do diferencial de células brancas também foi realizada utilizando-se microscopia de luz.

Fibrinogênio

Para a determinação do fibrinogênio (mg dL⁻¹) utilizou-se o aparelho HumacLOT Duo³, que é um coagulômetro que realiza a mensuração desse parâmetro mediante um sistema óptico, que detecta uma variação repentina na densidade óptica, quando um coágulo é formado.

Glicose, Creatina quinase (CK) e Gama glutamiltansferase (GGT)

Para a análise da glicose (mg dL⁻¹), CK (U L⁻¹) e GGT (U L⁻¹) foram utilizados kits específicos para cada parâmetro. A leitura foi realizada sob o fundamento de química seca, mediante fotometria de refletância, utilizando o aparelho da marca Reflotron®⁴.

¹Rankin Biomedical Corporation: 14515 Mackey Road, Ste. 100 Holly, MI 48442, USA.

²International Medical Equipment: 170 Vallecitos De Oro, San Marcos, CA 92069, USA.

³Comercializadora de Productos para Laboratorios Ltda.: Santafê de Bogotá, calle 106, No. 29-76, Colombia .

⁴Boehringer Mannheim Corporation: 9115 Hague Road, Indianapolis, IN 46256, USA.

Análise estatística

A estatística abaixo descrita variou com o objetivo de cada capítulo.

Capítulo II: em cada grupo (MT500, MT1000, FT500 e FT1000), as características hematológicas (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (fibrinogênio, glicose, CK e GGT) foram avaliadas ao longo do período de aplicação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 dias), assim como imediatamente antes (0 hora) e após cada aplicação do ozônio (1, 6 e 24 horas).

O estudo compreendeu uma análise de regressão, para avaliar o comportamento de todas as características em função do tempo de amostragem (horas) em cada período de aplicação (dias) e para cada combinação estudada, cujos coeficientes foram testados pelo teste t a 5% de probabilidade.

Capítulo III: em cada grupo (MT500, MT1000, FT500 e FT1000), as características hematológicas (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (fibrinogênio, glicose, CK e GGT) foram avaliadas ao longo do período de aplicação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 dias).

No dia 27, as características também foram avaliadas para se verificar a durabilidade dos resultados depois de realizado o último período de aplicação do ozônio, porém sem que o mesmo fosse administrado aos animais.

Com o objetivo de monitorar o comportamento médio das características ao longo do período de aplicação, se construíram gráficos de controle de Shewhart, para cada combinação, sendo a linha média (LM) constituída pela média amostral geral e os limites de controle inferior (LIC) e superior (LSC), estimados para $k=3$.

Capítulo IV: foi realizado um esquema fatorial 2x2, relativo aos fatores aplicação de ozônio com duas dosagens (T500=concentração máxima de 500 mL, e T1000=concentração máxima de 1000 mL) e sexo (M: macho e F: fêmea), distribuídos segundo o desenho inteiramente casualizado com três repetições.

Em cada tratamento (MT500, MT1000, FT500 e FT1000), as características hematológicas (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica

sangüínea (glicose, CK, GGT e fibrinogênio) foram avaliadas ao longo do período de aplicação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 dias).

Para a análise do fatorial 2x2 em cada período de aplicação, os resultados das características avaliadas foram constituídos pelas médias de todos os tempos de amostragem. Para isso, foi realizado o teste F, com o objetivo de verificar os efeitos principais dos dois fatores e da interação entre eles, até 5% de probabilidade, em cada período de aplicação separadamente.

Os principais efeitos dos dois fatores foram definidos como a diferença no valor da resposta quando se passa da dosagem T500 para a T1000 ou do sexo F para o M. Assim, os efeitos positivos foram estimados quando os valores da dosagem T1000 e do sexo M foram maiores que os da dosagem T500 e do sexo F, respectivamente. Caso contrário, as estimativas dos efeitos seriam negativas.

No caso da interação, os efeitos positivos foram obtidos quando a média dos tratamentos MT1000 e FT500 foram maiores que a média dos tratamentos MT500 e FT1000. Caso contrário, os efeitos seriam negativos.

Capítulo V: em cada grupo (MT500, MT1000, FT500 e FT1000) estudado, os parâmetros FC e FR foram avaliados ao longo do período de aplicação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 dias), assim como imediatamente antes (0 horas) e após cada aplicação do ozônio (10 e 20 minutos).

A primeira parte do estudo compreendeu uma análise de regressão, para estudar a relação de dependência dos parâmetros estudados em função do tempo de recuperação (T) em minutos, para cada período de aplicação (dias) e tratamento, a 5% de probabilidade pelo teste t.

O segundo estudo foi realizado com o objetivo de monitorar o comportamento da FC e FR ao longo do período de aplicação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 dias), assim foram construídos gráficos de controle de Shewhart, para cada tratamento, sendo a linha média (LM) constituída pela média amostral e os limites de controle inferior (LIC) e superior (LSC), estimados para $k=3$.

Na terceira parte do estudo foi realizado um esquema fatorial 2x2, relativo aos fatores aplicação do ozônio com dois níveis (T500=concentração máxima de 500 mL, e T1000=concentração máxima de 1000 mL) e sexo (M: macho e F: fêmea), distribuídos segundo o desenho inteiramente casualizado com três repetições. Todos os grupos foram avaliados ao longo do período de aplicação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21

e 24 dias). Para isso, foi realizado o teste F, com o objetivo de verificar os principais efeitos dos dois fatores e da interação entre eles, até 5% de probabilidade.

Para a análise do fatorial 2x2 e para a construção dos gráficos de controle, em cada período de aplicação, os resultados dos parâmetros avaliados foram constituídos pelas médias de todos os tempos de amostragem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.M.G. **Apoptose e efeitos da pentoxilina e do ozônio no jejuno de equinos sob isquemia, congestão e reperfusão**. Belo Horizonte, MG: UFMG, 2003. 91p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2003
- AL-DALIEN, S.M.; MENÉNDEZ S.; MARTÍNEZ, G.; FERNÁNDEZ-MONTEQUÍN, J.I; CANDELARIO, E.J.; LEÓN, O.S. Ozone therapy effects in the oxidative stress associated to diabetes mellitus. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.18, n.1, p.29-31, 1999.
- 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, p.433-437, 2004.
- BULIES, C.E. Una solución para exposiciones óseas postraumáticas: asociación de injerto de epiplon mayor con ozonoterapia. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.15, n.2, p.102-111, 1996.
- CAMPS, A.M.R.; ELIAS-CALLES, B.; DENIS, R.; LABRADA, A.; SANTANA, K.; SUÁREZ, K. Utilización del oleozon como alternativa de tratamiento en medicina veterinaria y su impacto en la salud animal. In: FORUM DE CIENCIA Y TECNICA, 15, 2003, La Habana. **Memorias...** La Habana: Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad de Granma, 2003. 6p.
- CASALECCHI, F.L. **Digestibilidade aparente total de dietas com milho submetido a diferentes processamentos e resposta glicêmica em equinos**. Pirassununga, SP: USP, 2003. 48p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2003.
- CLIVE, J.L.; FELBERG, S.; RICCI, G.M; ATIQUE, D.G.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C.; CORREA, P.E.D. Efeito terapêutico da aplicação intra-ocular de ozônio em modelo experimental de endoftalmite por *Staphylococcus epidermidis* em coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.67, n.4, p. 575-579, 2004.
- DÍAZ, A.B.; GARCÍA, M.M.; PIÑA, C.M.; MENÉNDEZ, S.C. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes diabéticos tratados con ozonoterapia: informe preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.20, n.1, p.45-47, 2001.
- DÍAZ, S.L.; GONZÁLEZ, J.M.; GONZÁLEZ, Y.H.; WONG, R. Estudio de pacientes sometidos a ozonoterapia mediante el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales. **Anuario Toxicología**, v.1, n.1, p.88-92, 2001.
- DI PAOLO, N.; BOCCI, V.; GAGGIOTTI, E. Ozonotherapy. **Int. J. Artif. Organs**, v.27, n.3, p.168-175, 2004.

- ESPINOSA, E.E.E.; MARICHAL, S.M.; ESPINOSA, E.M. Ozonoterapia en el tratamiento de las crisis vaso-oclusivas, en pacientes con anemia drepanocítica. **Rev. Cubana** 16 de Abril, v.39, n.2, p.4, 2000.
- GIUNTA, R.; COPPOLA, A.; LUONGO, C.; SAMMARTINO, A.; GUASTAFIERRO, S.; GRASSIA, A.; GIUNTA, L.; MASCOLO, L.; TIRELLI, A.; COPPOLA, L. Ozonized autohemotransfusion improves, hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Ann Hematol.**, v.80, n.12, p.745-748, 2001.
- GONZÁLEZ, Y.; REMIGIO, A.; ZAMORA, Z.; FONSECA, G. Ozonoterapia: efectos genotóxicos en sangre periférica de ratón. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.18, n.1, p.37-39, 1999.
- GUERRA, X.V.; LIMONTA, Y.N.; CONTRERAS, I.H.; FREYRE, R.L.; RAMÍREZ, A.M.P. Resultados de los costos en ozonoterapia. **Rev. Cubana Enfermer.**, v.15, n.2, p.104-108, 1999.
- HERNÁNDEZ, O.D.; GONZÁLEZ, R.C. Ozonoterapia en úlceras flebotómicas. **Rev. Cubana Cir.**, v.40, n.2, p.123-129, 2001.
- NAVIL, J.; BENITEZ, H.R.; CAMPS, A.M. Determinación del efecto cicatrizante del oleozon en aves domésticas considerando algunos indicadores hematológicos. **Rev. Electron. Vet.**, v.5, n.9, p.9, 2004.
- OGATA, A.; NAGAHATA, H. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, n.7, p. 681-686, 2000.
- PASTORIZA, J.M. **El ozono - forma de aplicación tópica en distintas patologías, en equinos deportivos**, Mayo, 2002. <<http://www.remonta.mil.ar/content/trabajo001.htm>>. 20 de Janeiro, 2005.
- PÉREZ, N.I.M.; FERNÁNDEZ, J.L.C.; CEPERO, S.M. Ozonoterapia en el síndrome de malabsorción intestinal secundario a parasitismo por *Giardia lamblia*: Estudio preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.22, n.3, p.145-149, 2003.
- PILOTO, V.C.; URRUTIA, Z.E.A. Efectividad del oleozón en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. **Rev. Cubana Estomatol.**, v.37, n.3, p.140-145, 2000.
- RECIO DEL PINO, E.; SERRANO, M.A.; RODRÍGUEZ DEL RIO, M. Aspectos de la ozonoterapia en pacientes con neuropatía periférica epidémica. **Rev. Cubana Enfermer.**, v.15, n.2, p.114-118, 1999.
- SCROLLAVEZZA, P.; ABBONDI, M.; POGLIACOMI, B.; GUARESCHI, D.; DALL'AGLIO, R.; POLDI, R.; PEZZOLI, G. Ozone treatment in mastitis, metritis and retention of fetal membranes in the dairy cow. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF OZONE APPLICATIONS, 2, 1997, Havana. **Proceedings...** Havana: Centro de Investigaciones del Ozono, 1997. 76p.

TYLICKI, L.; NIEWEGLOWSKI, T.; BIEDUNKIEWICZ, B.; CHAMIENIA, A.; DEBSKA-SLIZIEN, A.; ALEKSANDROWICZ, E.; LYSIAK-SZYDLOWSKA, W.; RUTKOWSKI, B. The influence of ozonated autohemotherapy on oxidative stress in hemodialyzed patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs. **Int. J. Artif. Organs**, v.26, n.4, p.297-303, 2003.

ZAMORA, Z.B.; SCHULZ, S.; MENÉNDEZ, S.; BETTE, M.; MUTTERS, R.; HOFFMANN, S. Evaluación de pretratamientos con ozono combinado con antibióticos en un modelo de peritonitis post-operatoria en ratas. Comportamiento de citocinas proinflamatorias. In: TALLER NACIONAL SOBRE INFLAMACIÓN, 2, 2001, La Habana. **Memorias...** La Habana: Sociedad Cubana de Farmacología, 2001. 116p.

ZEE, VAN DER H.; DE MONTE A. Ozone auto-haemotherapy in lower limb ulcerations In: WORLD OZONE CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.

CAPITULO II
COMPORTAMENTO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS SANGÜÍNEOS NO PERÍODO DE REPOUSO DURANTE
APLICAÇÃO DE OZÔNIO EM EQUINOS

RESUMO

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Efeitos da ozonioterapia sobre parâmetros clínicos, hematológicos e da bioquímica sangüínea em equinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza, Co-Orientadores: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, o comportamento dos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (glicose, fibrinogênio, creatina quinase e gama glutamiltransferase), durante o tempo de repouso entre aplicações de ozonioterapia. Para isso, foram utilizados 12 equinos mestiços sadios, sendo 6 machos e 6 fêmeas, com idades compreendidas entre 4 e 20 anos. Os animais foram submetidos à ozonioterapia, mediante administração de 500 ou 1000 mL da mistura do gás, por via intravenosa, a cada três dias, por um período total de 24 dias. Os animais foram divididos em quatro grupos: MT500, MT1000, FT500 e FT1000, sendo machos (M) que receberam 500 mL e 1000 mL e, fêmeas (F) que receberam 500 e 1000 mL, respectivamente. Os resultados demonstraram que os únicos parâmetros que sofreram efeito linear durante o período de repouso foram a contagem total de plaquetas e a concentração de glicose e de gama glutamiltransferase, que revelaram concentração aumentada (plaquetas) ou diminuída (glicose e gama glutamiltransferase).

Palavras-chave: cavalos, ozonioterapia, hematologia, bioquímica sangüínea.

ABSTRACT

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2006. **Effects of ozone therapy on equine clinical, hematological and blood biochemistry parameters.** Adviser: Maria Verônica de Souza, Co-Advisers: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

The purpose for this study was to assess, *in vivo*, the hematological (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, neutrophils, bands, lymphocytes, monocytes, basophils, eosinophils and platelets) and biochemical parameters (glucose, fibrinogen, creatine kinase and gamma glutamyltransferase) pattern, within the resting period in between each ozone application. Twelve cross bred horses, 6 males and 6 females, between 4 and 20 years old were exposed to ozone therapy through the intravenous application of 500 and 1000 mL of the gas mixture, every three days, during 24 days. Four groups were conformed: MT500, MT1000, FT500 and FT1000, which comprised males (M) and females (F) receiving 500 and 1000 mL of ozone, respectively. Only the platelets count and glucose and gamma glutamyltransferase concentrations, revealed a linear pattern in response to ozone therapy during the resting period. The former was increased and the others diminished.

Key-words: horses, ozone therapy, hematology, blood biochemistry.

INTRODUÇÃO

Na procura de métodos menos invasivos, mais baratos, porém eficazes e menos nocivos à saúde, é cada vez mais evidente o interesse por protocolos medicamentosos alternativos ou complementares aos tratamentos convencionais.

A ozonioterapia é considerada uma forma de medicina alternativa por ainda não estar completamente elucidado o seu mecanismo de ação no organismo. No entanto, vários desses mecanismos já constituem linhas de pesquisa e protocolos de tratamento na medicina humana, estando ainda poucos explorados na medicina veterinária.

As pesquisas realizadas já demonstram como o ozônio é eficaz no tratamento de algumas afecções, sendo descritos alguns dos efeitos biológicos que este desencadeia no organismo humano e animal, embora a maioria da literatura científica tenha sido desenvolvida sob ambiente *in vitro* (Bocci 1994a).

Estes efeitos biológicos conferem ao ozônio propriedades terapêuticas que possibilitam sua utilização na área médica, com baixas porcentagens de risco ou de efeitos secundários ao ser aplicado pela via de administração adequada (Barroetabeña *et al.*, 2002; Escarpanter, 2005).

As interpretações na hematologia e da bioquímica sangüínea resultam complicadas por terem marcadas diferenças segundo a raça, atividade, condicionamento, idade e sexo do animal sob avaliação (Lumsden *et al.*, 1980, Ribeiro *et al.*, 2004, Santos, 2006).

Com o intuito de promover a pesquisa e aplicação da ozonioterapia em medicina veterinária, o objetivo deste estudo foi observar o comportamento imediato (até 24 horas) entre aplicações da mistura do gás, dos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (glicose, fibrinogênio, creatina quinase e gama glutamiltransferase), com a finalidade de verificar o efeito sobre os parâmetros acima mencionados durante o tempo de repouso e, se possível, detectar qual o melhor momento para realizar eficientemente a amostragem.

REVISÃO DE LITERATURA

Sánchez *et al.* (1998), constataram, ao aplicar azeite ozonizado em curativos de feridas de pele em ratos, ação estimuladora do processo de fibroplasia. Matsumoto *et al.* (2001), utilizaram por via tópica azeite de oliva ozonizado, com êxito na regressão de feridas crônicas e fistulas pós-cirúrgicas em pacientes humanos. Já Camps *et al.* (2003), demonstraram a eficiente cicatrização de feridas após castração de suínos da raça Yorkshire, com aplicações tópicas diárias de óleo ozonificado por cinco dias.

No estudo da influência do ozônio sobre o processo de cicatrização em camundongos, Sánchez *et al.* (1998), consideraram períodos maiores de avaliação: 24 horas, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 e 32 dias depois de realizados tratamentos diários com óleo de girassol e ozônio por sete dias consecutivos. Neste caso as avaliações foram realizadas pela observação de alterações macroscópicas e microscópicas.

Verrazo *et al.* (1995) ao estudar parâmetros hemorreológicos (deformabilidade de eritrócitos, porcentagem do hematócrito e concentração do fibrinogênio) em pacientes humanos com doença arterial vaso-oclusiva, realizaram amostragens em três tempos, 30 minutos antes, 15 minutos e 24 horas após o primeiro e último tratamento com ozonioterapia ou terapia hiperbárica. Estes autores conseguiram detectar alterações significativas no aumento da filtrabilidade dos eritrócitos e, com isto, diminuição da viscosidade do sangue depois de transcorridos 15 minutos ($p < 0,001$) do primeiro tratamento e 24 horas após o último ($p < 0,05$). O fibrinogênio diminuiu significativamente ($p < 0,05$), entretanto, os autores concluíram que estes resultados foram transitórios por não se repetirem depois de transcorridas 24 horas.

Ohtsuka *et al.* (2006) ao avaliarem a ativação imune, *in vivo*, em vacas sadias e sob alguma alteração inflamatória, após a administração de ozônio via autohemotransfusão, realizaram amostragens antes da AHT e no 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 14 dias depois da mesma. Ainda que não imediatas, as amostragens sanguíneas realizadas, conseguiram determinar alterações significativas na contagem dos linfócitos e monócitos no terceiro e quarto dia, respectivamente.

Quando avaliados fatores ativadores de plaquetas em porquinhos da índia (*Cavia porcellus*), Wright *et al.* (1994) realizaram amostragens imediatamente após exposição *in vitro* das plaquetas ao ozônio, dentro do minuto seguinte à exposição ao

gás, conseguindo observar alterações na concentração do fator ativador de plaquetas (PAF) que pode alterar a contagem desse parâmetro.

Como pode ser observado, tempos diferentes têm sido considerados em vários estudos realizados com ozônio; porém, nenhum sustenta o porquê do determinado protocolo nem mesmo discute qual o protocolo ideal para a amostragem dos parâmetros avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhum momento do período experimental, os animais demonstraram incômodo ou alteração do comportamento devido à ozonioterapia ou imediatamente após a mesma, assim como após as atividades diárias.

Entretanto, um dos animais apresentou um ferimento acidental, que ocorreu na época da oitava aplicação.

Durante avaliação clínica diária, os equinos não apresentaram sinais de alteração, encontrando-se todos com parâmetros clínicos dentro dos considerados como de referência para a espécie eqüina. Os valores médios de temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória foram de 37,01 °C, 34 bpm e de 24 rpm, respectivamente. As mucosas se mantiveram de cor rosácea e, úmidas e a tempo de preenchimento capilar inferior a dois segundos, tal como descrito por Speirs (1999), para a espécie eqüina.

Um discreto aumento da frequência cardíaca e/ou respiratória poderia ser observado, já que o estresse pode elevar estes parâmetros (Fernandes, 1997).

Durante a aplicação do ozônio, foi possível escutar, sem a utilização de estetoscópio, os movimentos intestinais dos animais, particularmente 5 minutos após o início da aplicação da mistura do gás. Além disso, todos os animais defecavam ao redor de meia hora após a aplicação do ozônio, o que pode sugerir estímulo ou ação do ozônio sobre os mecanismos do trato gastrointestinal. Pérez *et al.* (2003) avaliaram pacientes humanos com a síndrome de má absorção intestinal causada por *Giardia lamblia*, no entanto os autores não mencionaram achados semelhantes ao nosso.

Alves *et al.* (2004), estudaram o processo de isquemia e reperfusão no jejuno de equinos, demonstrando o efeito de proteção tecidual do ozônio sobre lesões de reperfusão no trato gastrointestinal ainda que a via de administração tenha sido a intravenosa.

O termo, tempo de repouso, utilizado neste estudo considera o período antes e mais próximo após cada aplicação de ozônio (0, 1, 6 e 24 horas), quando foram realizadas as coletas de sangue, sem que houvesse uma nova administração da mistura do gás.

De maneira geral, como demonstrado nas Tabelas de 1 a 5, os parâmetros hematológicos avaliados (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos), não

determinaram ($p>0,05$) um comportamento característico influenciado pela ozonioterapia em função do tempo de repouso (0, 1, 6 e 24 horas) durante as nove aplicações da mistura do gás; com exceção de alguns parâmetros, que revelaram alguma resposta ($p<0,05$) à terapia neste período de repouso, porém não em todos os períodos de aplicação. Desta maneira, estes achados indicam que até 24 horas após aplicação da mistura do gás não houve variações ($p>0,05$) nos valores dos parâmetros avaliados, o que reflete a semelhança entre os valores médios ou que o comportamento dos mesmos não demarcou um padrão linear.

Os valores do hematócrito (%) como apresentados na Tabela 1 refletem um comportamento constante sem variações no tempo de repouso, indicando que os valores médios para cada combinação estudada, foram similares ($p>0,05$) em cada período de aplicação, concordando com os relatos de Bocci (2004), que não encontrou alterações na concentração do hematócrito em diferentes trabalhos com humanos utilizando a autohemotransfusão ozonizada.

Os valores da concentração da hemoglobina (Tabela 1), também foram similares ($p>0,05$), no entanto as fêmeas mostraram em dois períodos de aplicação um efeito positivo ($p<0,05$) da ozonioterapia no período de repouso. Quando tratadas com 500 mL após o segundo período de aplicação, o efeito foi de incremento na concentração de hemoglobina de aproximadamente $0,141 \text{ g dL}^{-1}/\text{hora}$, durante o período de repouso e; quando tratadas com 1000 mL após o terceiro período de aplicação o efeito positivo foi de aproximadamente $0,572 \text{ g dL}^{-1}/\text{hora}$. Embora estes discretos aumentos não sejam consistentes, poderiam estar relacionados com a reação imediata do ozônio sobre células endoteliais, que segundo Bocci & Aldinucci (2004) e López (2005), leva a liberação do óxido nítrico para interagir com a hemoglobina, resultando em S-nitrosohemoglobina, encarregada das reações à distância, com relação ao transporte desta substância a outros sítios, modulando assim, através da vasodilatação, o efeito sobre a microcirculação e a oxigenação tissular.

Os valores médios na concentração de eritrócitos (Tabela 1) resultaram similares ($p>0,05$) durante o período de repouso quando os animais receberam 500 mL da mistura de ozônio; a diferença de quando receberam 1000 mL, quando foi observado o efeito da ozonioterapia neste período mencionado. Para os machos, o comportamento resultou negativo ($p<0,05$) diminuindo aproximadamente $0,037$ eritrócitos $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$ e; nas fêmeas, o efeito após a terceira e quarta aplicação, foi de aumento ($p<0,05$) de $0,087$ e $0,033$ eritrócitos $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$, respectivamente.

Uma possível diminuição pode indicar uma baixa porcentagem de hemólise (Bocci, 2004), em resposta ao estresse oxidativo na membrana celular dos eritrócitos (Sentürk *et al.*, 2001), porém não de maneira intensa, uma vez que este é um efeito transitório e seletivo (Verrazo *et al.*, 1995; Zimran *et al.*, 1999), não resultando em risco à saúde do animal exposto ao ozônio.

TABELA 1 - Estimativas dos parâmetros de hematócrito (%), hemoglobina (g dL⁻¹), eritrócitos (x10⁶ μL⁻¹) e leucócitos (x10³ μL⁻¹) em função do tempo de repouso (H) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.

<i>Parâmetro</i>	<i>Combinação Tratamento x Sexo</i>	<i>Período de Aplicação</i>	<i>Equação de Regressão</i>	<i>R²</i>	
<i>Hematócrito</i>	MT500	1-9	$\bar{Y} = 38,22$	-	
	FT500	1-9	$\bar{Y} = 40,46$	-	
	MT1000	1-9	$\bar{Y} = 40,63$	-	
	FT1000	1-9	$\bar{Y} = 41,44$	-	
<i>Hemoglobina</i>	MT500	1-9	$\bar{Y} = 9,26$	-	
	FT500	1; 3-9 2	$\bar{Y} = 10,48$ $\hat{Y} = 10,5024+0,140554*H$	0,89	
	MT1000	1-9	$\bar{Y} = 10,12$	-	
	FT1000	1-2; 4-9 3	$\bar{Y} = 10,45$ $\hat{Y} = 10,2068+0,571876*H$	0,80	
	<i>Eritrócitos</i>	MT500	1-9	$\bar{Y} = 7,80$	-
		FT500	1-9	$\bar{Y} = 9,36$	-
MT1000		1-7; 9 8	$\bar{Y} = 7,90$ $\hat{Y} = 8,71705-0,0378985*H$	0,80	
FT1000		1-2; 5-9 3	$\bar{Y} = 8,87$ $\hat{Y} = 8,58148+0,0872826*H$	- 0,94	
		4	$\hat{Y} = 9,12284+0,0329667*H$	0,94	
<i>Leucócitos</i>	MT500	1-9	$\bar{Y} = 7,55$	-	
	FT500	1-9	$\bar{Y} = 9,14$	-	
	MT1000	1-9	$\bar{Y} = 8,48$	-	
	FT1000	1-9	$\bar{Y} = 8,14$	-	

H = tempo de repouso em horas. * Significativo pelo teste t (p<0,05). MT500: machos tratados com 500 mL, MT1000: machos tratados com 1000 mL, FT500: fêmeas tratadas com 500 mL, FT1000: fêmeas tratadas com 1000 mL.

No tempo de repouso não houve diferença ($p>0,05$) entre os valores médios na contagem de leucócitos totais, como apresentado na Tabela 1. Na realidade, esta ausência de efeito está presente durante todo o período experimental, concordando com os achados de Terasaki *et al.* (2001) e Ohtsuka *et al.* (2006) na espécie bovina.

O comportamento dos segmentados no período de repouso resultou constante, refletindo médias similares no período de repouso. Com relação aos bastonetes, foram observadas algumas respostas à ozonioterapia durante o tempo de repouso (Tabela 2). Os valores médios na concentração de bastonetes nos machos tratados com a menor dose (500 mL) foram similares ($p>0,05$) dentro dessas horas de estudo; já as fêmeas que receberam esta mesma dosagem, após a quinta e sexta aplicação apresentaram aumento de 0,006 e 0,002 bastonetes $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$, respectivamente. Similarmente, quando a dose foi elevada a 1000 mL, o comportamento linear positivo ($p<0,05$) nos machos foi na razão de 0,021 bastonetes $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$ após a sexta aplicação e, nas fêmeas, o comportamento ($p<0,05$) foi de aumento (0,002 $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$) e diminuição (0,001 $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$) após a primeira e quinta aplicação, respectivamente.

Estes achados durante o tempo de repouso foram considerados como isolados e não relevantes pelo fato de terem ocorrido em apenas um ou dois períodos de aplicação, além de mostrarem padrões de aumento e diminuição, o que não sugere um comportamento uniforme durante o tempo de repouso. Ainda assim, o aumento na contagem destas células pode estar associado a um possível efeito direto sobre a medula óssea, tal como mencionado por Margalit *et al.* (2001), ao liberar estas células de rara ocorrência na circulação periférica dos animais.

Ao avaliar a concentração de linfócitos no tempo de repouso (Tabela 2) somente observou-se um comportamento decorrente da aplicação da ozonioterapia, após a segunda e quarta aplicação, com uma diminuição (0,188 $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$) e aumento (0,070 $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$) de linfócitos, respectivamente quando administrados 500 mL nas fêmeas. Quando aplicados 1000 mL nos machos a resposta positiva ($p<0,05$) foi na razão de 0,017 linfócitos $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$ no oitavo período.

Para os monócitos (Tabela 3), a resposta à ozonioterapia nos machos que receberam 500 mL, após o sexto e oitavo períodos de aplicação ($p<0,05$) mostrou aumento nestas células na razão de 0,003 e 0,006 monócitos $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$ respectivamente. Nas fêmeas submetidas à mesma dosagem da mistura do gás observou-se que após a sexta aplicação ($p<0,05$) a concentração aumentou em 0,019 monócitos $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$. É possível que estas células respondam de forma mais tardia

à exposição do ozônio, como relatado por Zee & De Monte (2001) em humanos com úlceras flebostáticas, com ocorrência mais tardia no aparecimento destas células no processo de reparação tissular.

TABELA 2 - Estimativas dos parâmetros de segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) e linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em função do tempo de repouso (H) para cada combinação tratamento x sexo e período de aplicação.

<i>Parâmetro</i>	<i>Combinação Tratamento x Sexo</i>	<i>Período de Aplicação</i>	<i>Equação de Regressão</i>	<i>R²</i>
<i>Segmentados</i>	MT500	1-9	$\bar{Y} = 4,38$	-
	FT500	1-9	$\bar{Y} = 3,84$	-
	MT1000	1-9	$\bar{Y} = 4,96$	-
	FT1000	1-9	$\bar{Y} = 4,82$	-
<i>Bastonetes</i>	MT500	1-9	$\bar{Y} = 0,04$	-
	FT500	1-4; 7-9	$\bar{Y} = 0,05$	-
		5	$\hat{Y} = 0,0213186+0,00605567*H$	0,89
		6	$\hat{Y} = 0,0127257+0,00211066*H$	0,85
	MT1000	1-5; 7-9	$\bar{Y} = 0,05$	-
		6	$\hat{Y} = -0,0137769+0,0210572*H$	0,90
	FT1000	2-4; 6-9	$\bar{Y} = 0,06$	-
		1	$\hat{Y} = -0,00503734+0,00249944*H$	0,94
		5	$\hat{Y} = 0,03337776-0,00134764*H$	0,81
	<i>Linfócitos</i>	MT500	1-9	$\bar{Y} = 2,63$
FT500		1; 3; 5-9	$\bar{Y} = 4,44$	-
		2	$\hat{Y} = 5,99115-0,187955 *H$	0,92
		4	$\hat{Y} = 3,80844+0,0699546 *H$	0,83
MT1000		1-7; 9	$\bar{Y} = 2,83$	-
		8	$\hat{Y} = 2,08309+0,0171071 *H$	0,99
FT1000		1-9	$\bar{Y} = 2,68$	-

H = tempo de repouso em horas. * Significativo pelo teste t ($p < 0,05$). MT500: machos tratados com 500 mL, MT1000: machos tratados com 1000 mL, FT500: fêmeas tratadas com 500 mL, FT1000: fêmeas tratadas com 1000 mL.

O comportamento dos valores médios na concentração de eosinófilos (Tabela 3) durante o período de repouso foi similar ($p > 0,05$), sendo apenas observado um aumento ($p < 0,05$) de 0,006 eosinófilos $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ /hora nos machos que receberam 500 mL da mistura do gás, depois de realizado o nono período de aplicação.

Quando a concentração de basófilos (Tabela 3) foi avaliada no período de repouso, a resposta à ozonioterapia foi observada ($p < 0,05$) nos machos e nas fêmeas com a menor dose após a sexta aplicação, no entanto de forma diferenciada, com aumento destas células ($0,001 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$) para os machos e diminuição ($0,002 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$) para as fêmeas. Quando as fêmeas receberam 1000 mL da mistura do gás, novamente houve ($p < 0,05$) diminuição ($0,002 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}/\text{hora}$) após o sétimo período de aplicação.

Da mesma forma como ocorreu com a contagem diferencial de outras células da linhagem branca, o comportamento da concentração de basófilos no tempo de repouso, apresentou resposta à ozonioterapia; porém, de forma isolada.

TABELA 3 - Estimativas dos parâmetros de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) e basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em função do tempo de repouso (H) para cada combinação tratamento x sexo e período de aplicação.

<i>Parâmetro</i>	<i>Combinação Tratamento x Sexo</i>	<i>Período de Aplicação</i>	<i>Equação de Regressão</i>	<i>R²</i>
<i>Monócitos</i>	MT500	1-5; 7; 9	$\bar{Y} = 0,15$	-
		6	$\hat{Y} = 0,182071 + 0,00331344 * H$	0,93
		8	$\hat{Y} = 0,231433 + 0,00558931 * H$	0,99
	FT500	1-5; 7-9	$\bar{Y} = 0,17$	-
		6	$\hat{Y} = 0,0918225 + 0,0191949 * H$	0,90
	MT1000	1-9	$\bar{Y} = 0,21$	-
FT1000	1-9	$\bar{Y} = 0,15$	-	
<i>Eosinófilos</i>	MT500	1-8	$\bar{Y} = 0,24$	-
		9	$\hat{Y} = 0,199253 + 0,00627923 * H$	0,82
	FT500	1-9	$\bar{Y} = 0,24$	-
	MT1000	1-9	$\bar{Y} = 0,27$	-
	FT1000	1-9	$\bar{Y} = 0,30$	-
<i>Basófilos</i>	MT500	1-5; 7-9	$\bar{Y} = 0,10$	-
		6	$\hat{Y} = 0,0356242 + 0,00139258 * H$	0,97
	FT500	1-5; 7-9	$\bar{Y} = 0,06$	-
		6	$\hat{Y} = 0,0616924 - 0,00246568 * H$	0,92
	MT1000	1-9	$\bar{Y} = 0,11$	-
	FT1000	1-6; 8-9	$\bar{Y} = 0,08$	-
7		$\hat{Y} = 0,0506193 - 0,00214442 * H$	0,99	

H = tempo de repouso em horas. * Significativo pelo teste t ($p < 0,05$). MT500: machos tratados com 500 mL, MT1000: machos tratados com 1000 mL, FT500: fêmeas tratadas com 500 mL, FT1000: fêmeas tratadas com 1000 mL.

A contagem das plaquetas e a concentração da glicose nos equinos expostos ao ozônio revelaram uma resposta à ozonioterapia com um comportamento linear ($p < 0,05$) durante o tempo de repouso (Tabela 4).

TABELA 4 - Estimativas dos parâmetros de plaquetas (por campo) e glicose (mg dL^{-1}), em função do tempo de repouso (H) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.

Parâmetro	Combinação Tratamento x Sexo	Período de Aplicação	Equação de Regressão	R^2	
Plaquetas	MT500	2; 4-6; 9	$\bar{Y} = 9,93$	-	
		1	$\hat{Y} = 7,20903 + 0,155824 * H$	0,96	
		3	$\hat{Y} = 13,4277 - 0,184216 * H$	0,99	
		7	$\hat{Y} = 7,49631 + 0,0972502 * H$	0,82	
		8	$\hat{Y} = 9,52895 - 0,0359937 * H$	0,92	
	FT500	1-9	$\bar{Y} = 10,12$	-	
	MT1000	1-4; 6; 9	$\bar{Y} = 10,04$	-	
			5	$\hat{Y} = 6,99955 + 0,193606 * H$	0,98
			7	$\hat{Y} = 7,81958 + 0,120054 * H$	0,99
			8	$\hat{Y} = 8,30226 + 0,122289 * H$	0,95
	FT1000	4; 6-9	$\bar{Y} = 9,30$	-	
			1	$\hat{Y} = 7,07914 + 0,650570 * H$	0,96
			2	$\hat{Y} = 11,8039 - 0,103734 * H$	0,86
			3	$\hat{Y} = 12,2166 - 0,135480 * H$	0,95
			5	$\hat{Y} = 9,455227 + 0,167449 * H$	0,95
Glicose	MT500	1-2; 4-6; 8	$\bar{Y} = 85,31$	-	
		3	$\hat{Y} = 89,7125 - 0,511290 * H$	0,99	
		7	$\hat{Y} = 76,5410 + 0,403309 * H$	0,88	
		9	$\hat{Y} = 82,6550 - 0,299575 * H$	0,83	
	FT500	1-3; 6-9	$\bar{Y} = 91,20$	-	
			4	$\hat{Y} = 93,4118 - 0,334854 * H$	0,92
			5	$\hat{Y} = 90,3720 - 0,413593 * H$	0,90
	MT1000	1-6; 8-9	$\bar{Y} = 88,32$	-	
			7	$\hat{Y} = 83,0709 + 0,980103 * H$	0,92
	FT1000	1-6; 9	$\bar{Y} = 85,02$	-	
			7	$\hat{Y} = 75,8185 + 1,27074 * H$	0,95
			8	$\hat{Y} = 79,9106 - 0,278784 * H$	0,86

H = tempo de repouso em horas. * Significativo pelo teste t ($p < 0,05$). MT500: machos tratados com 500 mL, MT1000: machos tratados com 1000 mL, FT500: fêmeas tratadas com 500 mL, FT1000: fêmeas tratadas com 1000 mL.

O único grupo sob avaliação que apresentou os valores médios na contagem de plaquetas similares ($p > 0,05$), durante todo o período foram as fêmeas quando receberam 500 mL de ozônio. Quando os machos receberam 500 mL da mistura do gás, refletiram uma resposta à ozonioterapia durante o tempo de repouso após a primeira, terceira, sétima e oitava aplicação (Tabela 4), o que indica um comportamento linear ($p < 0,05$) para este parâmetro. Porém, a escolha do momento mais adequado para a avaliação destes parâmetros de amostragem até as 24 horas subseqüentes à ozonioterapia, dependerá do interesse clínico, ou seja, se o relevante for determinar os valores máximos, o ideal seria realizar a amostragem imediatamente depois de realizada a ozonioterapia. Por outro lado, cabe mencionar que estas respostas observadas (aumento e diminuição) na contagem de plaquetas, não definem claramente o comportamento da característica neste tempo de estudo, mas pode estar indicando certa alteração na fluidez do sangue, já mencionada na literatura científica (Bocci, 1994a; Giunta *et al.*, 2001), além da resposta plaquetária no momento mais próximo à administração da mistura do gás (Wright *et al.*, 1994; Valacchi & Bocci, 1999; Díaz *et al.*, 2001).

Na tentativa de elucidar o comportamento no tempo de repouso da concentração da glicose, observou-se a resposta à ozonioterapia nos machos tratados com 500 mL em três períodos de aplicação, o que reflete um comportamento linear ($p < 0,05$) deste parâmetro no tempo referido. Como este é um parâmetro que diminui por efeito do ozônio (Al Dalien *et al.*, 1999; Barroetabeña *et al.*, 2002) e até 24 horas continuaria a diminuir, a amostragem para avaliação do mesmo está indicada até as 24 horas, quando se deseja verificar o máximo efeito na diminuição da glicose e, com isto poder prevenir um quadro de hipoglicemia transitória decorrente da ozonioterapia. Já as fêmeas tratadas com a mesma quantidade (500 mL) da mistura do gás apresentaram resposta ($p < 0,05$) à ozonioterapia durante o tempo de repouso, após a quarta e a quinta aplicação, com diminuição na concentração deste parâmetro 0,335 e 0,414 mg dL⁻¹/hora, respectivamente.

Quando os machos receberam 1000 mL de ozônio, somente foi observada resposta à terapia após o sétimo período de aplicação, com aumento na concentração da glicose em 0,980 mg dL⁻¹/hora. Já as fêmeas que receberam esta mesma dosagem, mostraram diferentes ($p < 0,05$) respostas à ozonioterapia na sétima e oitava aplicação, com aumento (1,271 mg dL⁻¹/hora) e diminuição (0,279 mg dL⁻¹/hora), respectivamente, na concentração da glicose, o que não permite demarcar um

comportamento definido deste parâmetro neste tempo, por apresentar efeito somente em um ou dois períodos de aplicação.

Quando estudados os valores médios da concentração do fibrinogênio no tempo de repouso (Tabela 5), estes não variaram ou definiram um comportamento constante ($p > 0,05$) em resposta a ozonioterapia. Os machos tratados com 500 mL apresentaram uma resposta somente após a última aplicação da mistura do gás, diminuindo a concentração deste parâmetro em $0,550 \text{ mg dL}^{-1}/\text{hora}$. Por outro lado as fêmeas que receberam a mesma dose, apresentaram um aumento na concentração do fibrinogênio de forma linear durante o tempo de repouso após a quarta aplicação ($1,307 \text{ mg dL}^{-1}/\text{hora}$). Quando os machos receberam 1000 mL da mistura do gás, ocorreu aumento de $4,077 \text{ mg dL}^{-1}/\text{hora}$ na concentração do fibrinogênio após a terceira aplicação. Apesar destes achados, o comportamento não foi constante, não sendo observado nas demais aplicações de ozônio durante o período experimental.

Com relação à concentração da enzima creatina quinase (Tabela 5) observou-se de modo geral que não houve efeito ($p > 0,05$) da ozonioterapia durante o tempo de repouso. Apenas foi detectado que os machos que receberam o tratamento de 500 mL apresentaram após a nona aplicação, aumento ($p < 0,05$) de $9,484 \text{ U L}^{-1}/\text{hora}$ na concentração dessa enzima. Entretanto, quando tratados com 1000 mL da mistura do gás ocorreu ($p < 0,05$) diminuição ($2,132 \text{ U L}^{-1}/\text{hora}$) e aumento ($4,078 \text{ U L}^{-1}/\text{hora}$) após a terceira e a oitava aplicação, respectivamente. Não se observou qualquer influência ($p > 0,05$) no tempo de repouso nas fêmeas submetidas a ambos os tratamentos.

Comportamento linear, em resposta a ozonioterapia, ocorreu ($p < 0,05$) com a gama glutamiltransferase (Tabela 5), durante o tempo de repouso nos machos tratados com 500 mL da mistura do gás. A tendência deste parâmetro foi a diminuição na concentração desta enzima durante este tempo de repouso, podendo ser recomendada a amostragem próxima às 24 horas depois de realizada a terapia, quando a finalidade é a verificação de uma redução na concentração deste parâmetro. Quando tratados com 1000 mL de ozônio, os machos apresentaram diminuição na concentração da GGT em $0,238 \text{ U L}^{-1}/\text{hora}$, após o sétimo período de aplicação.

Este efeito além de imediato pode ser acumulativo, indicando adaptação à terapia, tal como mencionado por Bocci (2004), podendo estar relacionado com o aumento no trabalho muscular cardíaco pelo incremento no fluxo sanguíneo (Sunnen, 1989; Giunta *et al.*, 2001).

TABELA 5 - Estimativas dos parâmetros de fibrinogênio (mg dL⁻¹), creatina quinase (U L⁻¹) e gama glutamiltransferase (U L⁻¹), em função do tempo de repouso (H) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.

<i>Parâmetro</i>	<i>Combinação Tratamento x Sexo</i>	<i>Período de Aplicação</i>	<i>Equação de Regressão</i>	<i>R²</i>
<i>Fibrinogênio</i>	MT500	1-8	$\bar{Y} = 136,06$	-
		9	$\hat{Y} = 142,147 - 0,550101 * H$	0,80
	FT500	1-3; 5-9	$\bar{Y} = 145,04$	-
		4	$\hat{Y} = 121,411 + 1,30715 * H$	0,81
	MT1000	1-2; 4-9	$\bar{Y} = 137,46$	-
		3	$\hat{Y} = 127,931 + 4,07670 * H$	0,97
	FT1000	1-9	$\bar{Y} = 140,43$	-
	<i>Creatina Quinase</i>	MT500	1-8	$\bar{Y} = 207,75$
9			$\hat{Y} = 151,747 + 9,48424 * H$	0,93
FT500		1-9	$\bar{Y} = 215,37$	-
MT1000		1-2; 4-7; 9	$\bar{Y} = 208,64$	-
		3	$\hat{Y} = 229,984 + 2,13228 * H$	0,89
8		$\hat{Y} = 218,730 + 4,07780 * H$	0,98	
FT1000		1-9	$\bar{Y} = 212,59$	-
<i>Gama glutamiltransferase</i>		MT500	2; 5-8	$\bar{Y} = 11,79$
	1		$\hat{Y} = 12,1411 - 0,0285267 * H$	0,80
	3		$\hat{Y} = 16,3640 - 0,0383635 * H$	0,98
	4		$\hat{Y} = 8,33607 + 0,0184641 * H$	0,95
	9		$\hat{Y} = 10,9401 - 0,192265 * H$	0,98
	FT500	1-7	$\bar{Y} = 6,52$	-
		8	$\hat{Y} = 6,52224 - 0,0289984 * H$	0,88
		9	$\hat{Y} = 10,6360 - 0,230668 * H$	0,98
	MT1000	1-6; 8-9	$\bar{Y} = 13,80$	-
		7	$\hat{Y} = 12,8675 - 0,238381 * H$	0,92
	FT1000	1-7	$\bar{Y} = 20,44$	-
		8	$\hat{Y} = 16,6698 - 0,0754527 * H$	0,83
		9	$\hat{Y} = 15,0122 - 0,248560 * H$	0,88

H = tempo de repouso em horas. * Significativo pelo teste t (p<0,05). MT500: machos tratados com 500 mL, MT1000: machos tratados com 1000 mL, FT500: fêmeas tratadas com 500 mL, FT1000: fêmeas tratadas com 1000 mL.

No tempo de repouso não houve diferença (p>0,05) entre os valores médios na contagem de leucócitos totais, como apresentado na Tabela 1. Na realidade, esta

ausência de efeito está presente durante todo o período experimental, concordando com os achados de Terasaki *et al.* (2001) e Ohtsuka *et al.* (2006) na espécie bovina.

Linder (2000), ao proporem variáveis da bioquímica sanguínea para avaliar o desempenho esportivo em eqüinos, menciona que níveis altos de GGT podem demonstrar desempenho negativo em animais da espécie.

O aumento inicial na concentração de GGT, observado neste estudo, revela esse efeito de esforço em todos os grupos.

A avaliação do comportamento das fêmeas não constatou uma resposta linear à ozonioterapia na concentração da GGT. Ficou evidenciado que, após a oitava e nona aplicação houve diminuição ($p < 0,05$) na concentração desta enzima em 0,029 e 0,231 U L⁻¹/hora, respectivamente, quando aplicados 500 mL. Diminuição também foi observada nestes mesmos períodos após aplicação de 1000 mL de ozônio (0,075 e 0,248 U L⁻¹/hora, respectivamente).

Diante dos resultados obtidos, recomenda-se que quando os parâmetros contagem total de plaquetas, concentração da glicose e da GGT forem avaliados com a finalidade de se verificar a eficácia da ozonioterapia em eqüinos, que estes sejam determinados não somente durante a administração da mistura do gás, mas também após cada aplicação, tendo em vista que apresentam um comportamento linear no tempo de repouso.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo experimental e com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Os parâmetros bastonetes, plaquetas, glicose e gama glutamiltransferase sofrem efeito do ozônio nas seguintes 24 horas depois de realizada a ozonioterapia, sendo neste caso recomendado a realização seriada de amostragens neste período, quando se deseja verificar variação na concentração destes parâmetros.
2. Existe pouco efeito da ozonioterapia no período de repouso nos parâmetros hemoglobina, eritrócitos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos, fibrinogênio e creatina quinase.
3. Não existe efeito do ozônio nos parâmetros hematócrito, leucócitos totais e segmentados nas 24 horas após administração da mistura do gás, não sendo assim necessária a amostragem imediata (até 24 horas) para a avaliação dos mesmos.
4. A exposição de equinos sadios a 500 e 1000 mL da mistura terapêutica de ozônio, mediante autohemotransfusão não acarreta alterações clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DALIEN, S.M.; MENÉNDEZ S.; MARTÍNEZ, G.; FERNÁNDEZ-MONTEQUÍN, J.I; CANDELARIO, E.J.; LEÓN, O.S. Ozone therapy effects in the oxidative stress associated to diabetes mellitus. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.18, n.1, p.29-31, 1999.
- 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 eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, p.433-437, 2004.
- BARROETABEÑA A.R.; SÁNCHEZ A.A.; GUERRA J. M. Acción del aceite ozonizado sobre el proceso inflamatorio en heridas de piel de animales de experimentación. **Corr. Med. Cient. Holg.**, v.6, n.2, p.1-10, 2002.
- BOCCI, V. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. **J. Int. Med. Res.**, v. 22, n.3, p.131-144, 1994 a.
- BOCCI, V. A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the early phase with ozonotherapy (autohaemotherapy), How 'inflammatory' cytokines may have a therapeutic role. **Mediators of Inflamm.**, v.3, n.3, p.315-321, 1994 b.
- BOCCI, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators Inflamm.**, v.13, n.1, p.3-11, 2004.
- BOCCI, V.; ALDINUCCI, C. Rational bases for using oxygen-ozonotherapy as a biological response modifier in sickle cell anemia and β -thalassemia: A therapeutic perspective. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents.**,v.18, n.1, p.38-44, 2004.
- CAMPS, A.M.R.; ELIAS-CALLES, B.; DENIS, R.; LABRADA, A.; SANTANA, K.; SUÁREZ, K. Utilización del oleozon como alternativa de tratamiento en medicina veterinaria y su impacto en la salud animal. In: FORUM DE CIENCIA Y TECNICA, 15, 2003, La Habana. **Memorias...** La Habana: Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad de Granma, 2003. 6p. CLAVO 2003
- CLAVO, B.; PÉREZ, J.L.; LÓPEZ, L.; SUÁREZ, G.; LLORET, M.; RODRÍGUEZ, V.; MACÍAS, V.; SANTANA, M.; MORERA, J.; FIUZA, D.; ROBAINA, F.; GÜNDEROTH, M. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. **J. Altern. Complement. Med.**, v.9, n.2, p.251-256, 2003.
- DEATON, C.M.; MARLIN, D.J.; SMITH, N.C.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; SCHROTER, R.C.; KELLY, F. J. Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. **Equine Vet. J.**, v.37, n.3, p.243-249, 2005.

- DÍAZ, A.B.; GARCÍA, M.M.; PIÑA, C.M.; MENÉNDEZ, S.C. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes con enfermedades vasculares periféricas: informe preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.20, n.1, p.45-47, 2001.
- DUCUSSIN, R.J.; NISHIMURA, M.; SARASHINA, T.; USUKA, Y.; TANABE, S.; OTANI, M. Phagocytosis of bovine blood and milk polymorphonuclear leukocytes after ozone gas administration *in vitro*. **J. Vet. Med. Sci.**, v.65, n.4, p.534-539, 2003.
- ESCARPANTER, J.C. Oxígeno-ozonoterapia como coadyuvante en el tratamiento de las infecciones óseas. **Rev. Cubana Ortop. Traumatol.**, v.19, n.1, p.4-9, 2005
- FERNANDES, W.R. Avaliação clínica do sistema circulatório. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária**, n.19, p.69-75, 1997.
- FILIPPI, A. Influence of ozonised water on the epithelial wound healing process in the oral cavity. In: OZONE WORLD CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- GIUNTA, R.; COPPOLA, A.; LUONGO, C.; SAMMARTINO, A.; GUASTAFIERRO, S.; GRASSIA, A.; GIUNTA, L.; MASCOLO, L.; TIRELLI, A.; COPPOLA, L. Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Ann. Hematol.**, v.80, n.12, p.745-748, 2001.
- GUERRA, X.V.; LIMONTA, Y.N.; CONTRERAS, I.H.; FREYRE, R.L.; RAMÍREZ, A.M.P. Resultados de los costos en ozonoterapia. **Rev. Cubana Enfermer.**, v.15, n.2, p.104-108, 1999.
- HERNÁNDEZ, O.D.; GONZÁLEZ, R.C. Ozonoterapia en úlceras flebostáticas. **Rev. Cubana Cir.**, v.40, n.2, p.123-129, 2001.
- HINCHCLIFF, K.W., KANEPS, A.J., GEOR, R.J. **Equine sports medicine and surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Philadelphia: Saunders, 2004. 1364p.
- LINDER, A. Use of blood biochemistry for positive performance diagnosis of sport horses in practice. **Revue Méd. Vét.**, v.151, n.7, p.611-618, 2000.
- LÓPEZ, A.M.G. **Efectos del óxido nítrico inhalado en un modelo experimental de ventilación unipulmonar**. Barcelona, España: UB, 2005. 237p. Tese (Doctorado Medicina y Cirugía). Universitat de Barcelona, Departamento de Cirugía y Especialidades Quirúrgicas, 2005.
- LUMSDEN, J.H.; ROWE, R.; MULLEN, K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. **Can. J. Comp. Med.**, v.44, p.32-42, 1980.

- MARGALIT, M., ATTIAS, E., ATTIAS, D., ELSTEIN, D., ZIMRAN, A., MATZNER, Y. Effect of ozone on neutrophil function *in vitro*. **Clin. Lab. Haem.**, v.23, n.4, p.243-247, 2001.
- MATSUMOTO, A.; SAKURAI, S.; SHINRIKI, N.; SUZUKI, S.; MIURA, T. Therapeutic effects of ozonized olive oil in the treatment of intractable fistula and wound after surgical operation. In: WORLD OZONE CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- NOA, M.; HERNÁNDEZ, F.; HERRERA, S.; MENÉNDEZ, S.; CAPOTE, A.; AGUILAR, C. Morphological observations in rats treated with ozone by intramuscular applications. In: OZONE WORLD CONGRESS, 10, 1991, Monaco. **Proceedings...** Monaco: International Ozone Association, 1991. 940p.
- OGATA, A.; NAGAHATA, H. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, n.7, p. 681-686, 2000.
- OHTSUKA, H., OGATA, A., TERASAKI, N., KOIWA, M., KAWAMURA, S. Changes in leukocyte population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 68, n.2, p. 175-178, 2006.
- PÉREZ, N.I.M.; FERNÁNDEZ, J.L.C.; CEPERO, S.M. Ozonoterapia en el síndrome de malabsorción intestinal secundario a parasitismo por *Giardia lamblia*: Estudio preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.22, n.3, p.145-149, 2003.
- RIBEIRO, C.R.; NUNES, E.A.M.; SILVA, J.A.R.; GERMINARO, A. Avaliação de constituintes séricos em eqüinos e muares submetidos à prova de resistência de 76km, no Pantanal do Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1081-1086, 2004.
- SÁNCHEZ, A.A., DÍAZ, R.P., RODRÍGUEZ, G.G., LEYVA, S.E., DÍAZ, S.E., BORREGO, P.L. Acción del aceite ozonizado sobre la cicatrización de heridas de piel en animales de experimentación. **Rev. CENIC Cienc. Biol.**, v.29, n.3, p.181-184, 1998.
- SANTOS, V.P. **Variações hemato-bioquímicas em eqüinos de salto submetidos a diferentes protocolos de exercícios físicos**. Porto Alegre, RS: UFRS, 2006. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio do Grande do Sul. Faculdade de Veterinária, 2006.
- ŞENTÜRK, Ü.K.; GÜNDÜZ, F.; KURU, O.; AKTEKIN, M.; KIPMEN, D.; YALÇIN Ö.; BOR-KÜÇÜKATAY, M.; YEŞILKAYA, A.; BAŞKURT, O. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, v.91, n.5, p.1999-2004, 2001.
- SPEIRS, V. C. **Exame clínico de eqüinos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda, 1999. 366p.

- STEIN, R.B.S. **Avaliação de métodos para determinação da digestibilidade aparente utilizando farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) em eqüinos.** Pirassununga, SP: USP, 2002. 69p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2002.
- SUNNEN G. Ozone in medicine: overview and future directions. In: OZONE WORLD CONGRESS, 9, 1989, New York. **Proceedings...** New York: International Ozone Association, 1989. 1540p.
- TERASAKI, N.; OGATA, A.; OHTSUKA, H.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Changes of immunological response after experimentally ozonated autohemoadministration in calves. **J. Vet. Med. Sci.**, v.63, n.12, p.1327-1330, 2001.
- VALACCHI, G., BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. **Mediators Inflamm.**, v.8, n.4-5, p.205-209, 1999.
- VERRAZO, G.; COPPOLA, L.; LUONGO, C.; SAMMARTINO, A.; GIUNTA, R.; GRASSIA, A.; RAGONE, R.; TIRELLI, A. Hyperbaric oxygen, oxygen-ozone therapy, and rheologic parameters of blood in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Undersea Hyperb. Med.**, v.22, n.1, p.17-22, 1995.
- VIEBAHN, R. The biochemical processes underlying ozone therapy. **Ozone: Sci. Eng.**, v.7, n.4, p.275-285, 1985.
- WRIGHT, D.T.; ADLER, K.B.; AKLEY, N.J.; DAILEY, L.A.; FRIEDMAN, M. Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.127, n.1, p.27-36, 1994.
- ZEE, VAN DER H.; DE MONTE A. Ozone auto-haemotherapy in lower limb ulcerations In: WORLD OZONE CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- ZIMRAN, A.; WASSER, G.; FORMAN, L.; GELBART, T.; BEUTLER, E. Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. **Acta Haematol.**, v.102, n.3, p.148-151, 1999.

CAPITULO III

MONITORAMENTO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DURANTE OZONIOTERAPIA EM EQUINOS

RESUMO

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Efeitos da ozonioterapia sobre parâmetros clínicos, hematológicos e da bioquímica sangüínea em eqüinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza, Co-Orientadores: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

O objetivo deste estudo foi monitorar, *in vivo*, as tendências dos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (glicose, fibrinogênio, creatina quinase e gama glutamiltransferase), após ozonioterapia em eqüinos. Para isso, foram utilizados 12 eqüinos mestiços, sendo 6 machos e 6 fêmeas, com idades compreendidas entre 4 e 20 anos. Os animais foram submetidos a ozonioterapia, mediante administração de 500 ou 1000 mL da mistura do gás, por via intravenosa, a cada três dias, por um período total de 24 dias. Antes, porém, foram divididos em quatro grupos: MT500, MT1000, FT500 e FT1000, sendo machos (M) que receberam 500 mL e 1000 mL e, fêmeas (F) que receberam 500 e 1000 mL, respectivamente. Os resultados demonstraram uma tendência positiva após ozonioterapia, mediante aumento nos valores do hematócrito e eritrócitos, sendo que, com relação aos últimos, as fêmeas mostraram médias superiores. Também ocorreu aumento na concentração dos segmentados, ainda que de forma tardia. Adicionalmente, foi possível verificar aumento transitório nos valores dos bastonetes, assim como comprovar o aumento na contagem das plaquetas e o efeito hipoglicemiante em todos os eqüinos. Com relação às enzimas, somente a gama glutamiltransferase apresentou uma elevação inicial bastante evidente, com posterior redução em todos os grupos.

Palavras-chave: cavalos, ozônio, hematologia, bioquímica sangüínea.

ABSTRACT

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2006. **Effects of ozone therapy on equine clinical, hematological and blood biochemistry parameters.** Adviser: Maria Verônica de Souza, Co-Advisers: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

The purpose for this study was to monitor, *in vivo*, the hematological (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, neutrophils, bands, lymphocytes, monocytes, basophils, eosinophils and platelets) and biochemical (glucose, fibrinogen, creatine kinase and gamma glutamyltransferase) parameters tendencies, after ozone therapy was applied in horses. Twelve cross bred horses, 6 males and 6 females, between 4 and 20 years old were exposed to ozone therapy through the application of 500 and 1000 mL of the gas mixture, intravenously, every three days, during 24 days. Four groups were conformed: MT500, MT1000, FT500 and FT1000, which comprised males (M) and females (F) receiving 500 and 1000 mL of ozone, respectively. The results demonstrate a positive tendency with increased hematocrit and erythrocytes, the later count was greater within the mares. Neutrophils count was increased in a later phase. Furthermore, a transient augment in bands count, platelets and a hypoglycemic effect within each experimental group was seen. Only gamma glutamyltransferase showed an evident initial increase with a later decrease in each group.

Key-words: horse, ozone, hematology, blood biochemistry

INTRODUÇÃO

Os parâmetros hematológicos e da bioquímica sangüínea em eqüinos podem variar segundo a fase etária, fisiológica, sexo, raça, exercício ou atividade física (Lumsden *et al.*, 1980, Ribeiro *et al.*, 2004, Santos, 2006), sendo assim importante verificar o comportamento e a tendência de alguns desses parâmetros quando se introduz uma nova terapia aos animais.

Ainda é escassa a literatura científica a respeito dos efeitos da ozonioterapia sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de interesse na espécie eqüina. Por outro lado, algumas informações estão disponíveis sobre as células vermelhas em humanos (Bocci, 2004), células brancas em bovinos (Ogata & Nagahata, 2000; Terasaki *et al.*, 2001, Ducusin *et al.*, 2003; Ohtsuka *et al.*, 2006) e plaquetas de porquinhos da índia (Wright *et al.*, 1994) submetidos a tratamento com ozônio. Adicionalmente, em eqüinos, o único trabalho disponível avaliou o efeito da aplicação de ozônio, através da autohemotransfusão, sobre o lactato de animais de corrida (Scrollavezza *et al.*, 1997).

Com o intuito de promover a pesquisa e aplicação em medicina veterinária da ozonioterapia, o objetivo deste estudo baseou-se em monitorar parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (glicose, fibrinogênio, creatina quinase e gama glutamiltransferase), mediante a observação das tendências, positivas e/ou negativas destes durante o período de aplicação *in vivo* de ozônio em eqüinos.

REVISÃO DE LITERATURA

A ozonioterapia já vem sendo utilizada amplamente em medicina humana na Europa, Ásia, Cuba e, atualmente, está despertando interesse na área de medicina veterinária nestas mesmas regiões e na América Latina e Estados Unidos, como uma alternativa ou complemento dos protocolos terapêuticos tradicionais pela sua eficiência e baixo custo.

Alguns estudos mencionam as vias de aplicação (Guerra *et al.*, 1999; Ogata & Nagahata, 2000; Hernández & Gonzalez, 2001; Camps *et al.*, 2003; Clavo *et al.*, 2003), sendo a respiratória a única não indicada para a realização da ozonioterapia, já que pode ocasionar lesões endoteliais, inflamação e aumento da permeabilidade (Noa *et al.*, 1991).

Existem estudos avançados sobre os efeitos do ozônio, porém aqueles básicos que elucidem mecanismos são poucos, o que dificulta as interpretações dos possíveis efeitos desta terapia, sendo assim considerada como um tratamento alternativo.

Na opinião de Viebahn (1985), o ozônio tem propriedades como bactericida, fungicida, viricida e sobre a circulação sanguínea.

Alguns trabalhos vêm pesquisando a resposta das células vermelhas (Bocci, 1994a; Zimran *et al.*, 1999) e brancas (Margalit *et al.*, 2001; Deaton *et al.*, 2005), quando expostas ao ozônio.

Os eritrócitos são o principal alvo do ozônio, provavelmente, pela superfície de contato que estes apresentam ao gás quando administrado no organismo. Pela reação oxidativa de membrana, pela melhoria nos aspectos reológicos das hemácias e, com isto, a circulação e distribuição do oxigênio para os tecidos, que passam a ser mais eficientes (Bocci, 1994a; Zimran *et al.*, 1999).

Margalit *et al.* (2001) e Deaton *et al.* (2005), mencionam que a ozonioterapia promove uma leucocitose com neutrofilia que, segundo os últimos autores, se deve ao aumento da capacidade de motilidade e adesão dos polimorfosnucleares (PMNs), o que intensifica a atividade fagocitária destas células. Adicionalmente, a exposição *in vivo* ao ozônio pode resultar em efeito direto sobre a mielopoiese (Bocci, 1994a; Margalit *et al.*, 2001).

A aplicação da mistura do gás *in vitro* em células PMNs, de vacas sadias, com mastite e febre do leite, pode ocasionar tanto efeitos positivos como negativos, dependendo se o animal esta ou não sadio (Ducusin *et al.*, 2003).

Bocci (1994b) e Ohtsuka *et al.* (2006), relatam o efeito do ozônio sobre células mononucleares. O primeiro descreve que o ozônio pode ser um indutor de citocinas, tais como interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6), interferon ($INF\beta$, $INF\gamma$), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral α ($TNF\ \alpha$) e fator transformador de crescimento β ($TGF\beta$), melhorando com isto a produção de imunoglobulinas e regulando o sistema imune. Já os segundos autores, mencionam a produção de citocinas após aplicação da mistura do gás por autohemotransusão (AHT) ozonizada, sendo a resposta humoral mais marcada em animais saudáveis. Os animais com processos inflamatórios mostram uma resposta particularmente do tipo celular.

A resposta inflamatória induzida pela exposição à mistura do gás oxigênio-ozônio pode estar relacionada ao aumento do fator de ativação plaquetária (PAF), o que incluiria também aumento nos níveis dos eucosanoídeos (Díaz *et al.*, 2001).

Tem sido mencionada a possibilidade da ativação de fibroblastos pelo ozônio e a importância na síntese de colágeno durante o processo de cicatrização; este e outros aspectos como aumento na quimiotaxia de células fagocitárias e liberação de citocinas, refletem a importância do ozônio em reduzir o tempo de cicatrização de feridas (Filippi, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhum momento do período experimental, os animais demonstraram incômodos ou alteração do comportamento durante a ozonioterapia ou imediatamente após a mesma, assim como após as atividades diárias.

Durante avaliação clínica diária os eqüinos não apresentaram sinais de alteração, encontrando-se todos com parâmetros clínicos dentro dos considerados como de referência para a espécie eqüina. Os valores médios de temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória foram de 37,01 °C, 34 bpm e de 24 rpm, respectivamente. As mucosas se mantiveram de cor rosácea e, úmidas e a taxa de preenchimento capilar inferior a dois segundos, tal como descrito por Speirs (1999), para a espécie eqüina. Entretanto, um dos animais apresentou um ferimento acidental, que ocorreu na época da oitava aplicação.

Um discreto aumento da frequência cardíaca e/ou respiratória poderia ser observado, já que o estresse pode elevar estes parâmetros (Fernandes, 1997).

Durante a aplicação do ozônio, foi possível escutar, sem a utilização de estetoscópio, os movimentos intestinais dos animais, particularmente 5 minutos após o início da aplicação da mistura do gás. Além disso, todos os animais defecavam ao redor de meia hora após a aplicação do ozônio, o que pode sugerir estímulo ou ação do ozônio sobre os mecanismos do trato gastrointestinal. Pérez *et al.* (2003) avaliaram pacientes humanos com a síndrome de má absorção intestinal causada por *Giardia lamblia* e tratados com ozonioterapia. No entanto os autores não mencionaram achado semelhante ao nosso.

Alves *et al.* (2004), estudaram o processo de isquemia e reperfusão no jejuno de eqüinos, demonstrando o efeito de proteção tecidual do ozônio sobre lesões de reperfusão no trato gastrointestinal ainda que a via de administração tenha sido a intravenosa.

Os resultados apresentados nas tabelas e figuras demonstrados a seguir refletem o efeito da ozonioterapia nos parâmetros avaliados durante todo o período experimental. O tempo zero corresponde ao início deste, onde os animais ainda não tinham sido expostos à mistura do gás. O tempo dez reflete médias dos resultados de amostragens obtidas após três dias de realizada a última aplicação do ozônio.

Os valores médios da porcentagem do hematócrito, resultantes da aplicação de ozônio (Tabela 1), encontraram-se dentro dos valores referenciais (26-53%) para a

espécie em estudo (Schalm *et al.*, 1975; Meyer *et al.*, 1995; Jain 1993, Menesis *et al.*, 1993, Taylor & Hillyer, 1997). No entanto, no período de aplicação do ozônio (Figura 1) foi possível observar uma tendência geral a um aumento no valor deste parâmetro nas combinações avaliadas, a exceção dos machos quando foram tratados com a menor dose (500 mL), os quais mostraram valores menores quando comparados com as fêmeas que receberam a mesma dose (500 mL). Neste grupo houve inclusive, no início da ozonioterapia, diminuição dos valores médios, sendo inferiores ao do limite inferior de controle (LIC) quando realizada a terceira aplicação. A maioria dos valores médios da concentração do hematócrito nos eqüinos encontrou-se acima do limite médio de controle (LM) durante a segunda metade do período experimental. Uma curva crescente até o final do período de aplicação foi mais evidente nas fêmeas tratadas com 1000 mL da mistura do gás, sendo esta tendência mais discreta nos machos tratados com esta mesma dose. Nos demais animais (MT500 e FT500), este aumento também foi observado, entretanto de forma ainda mais discreta.

Estes resultados indicam que os valores do hematócrito aumentam à medida que são realizadas as sessões da ozonioterapia, demonstrando um possível efeito acumulativo e dose dependente desta característica. Efeito similar acumulativo e dose dependente foram descritos por Bocci (1994a) e Valacchi & Bocci (1999), em humanos, Plopper *et al.* (1994), Wright *et al.* (1994) e Deaton *et al.*, (2005) em ratos, porquinhos da índia (*Cavia porcellus*), e eqüinos, respectivamente, que definiram a resposta pela dose e tempo de exposição à mistura do gás.

Já Verrazo *et al.* (1995) e Giunta *et al.* (2001), não encontraram mudanças na concentração do hematócrito, quando utilizada a ozonioterapia em pacientes humanos com doença arterial oclusiva periférica, apesar de terem observado alterações em outros parâmetros hemoreológicos relacionados, tal como a viscosidade do sangue, através de um viscosímetro digital e filtrabilidade dos eritrócitos, utilizando um filtro de policarbonato de 5 µm de diâmetro, sob pressão negativa de 20 cm de água, expressando os valores em eritrócitos filtrados por minuto, indicando o tempo utilizado para filtrar 1 mL de sangue.

TABELA 1 – Valores mínimos, máximos e médios do hematócrito (%) em equinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	33,00 - 44,2 38,00	35,8 - 41,00 37,67	36,80 - 41,4 38,63	32,70 - 37,20 34,90
1	37,38 - 38,00 37,78	36,50 - 40,28 37,93	35,00 - 43,73 38,27	34,23 - 38,6 35,86
2	33,30 - 41,15 38,49	37,63 - 41,28 39,94	31,03 - 48,48 40,56	38,30 - 39,43 38,83
3	30,83 - 39,58 35,64	40,50 - 42,10 41,32	37,15 - 42,48 39,78	38,53 - 48,78 42,97
4	31,85 - 40,80 36,94	41,85 - 42,50 42,08	36,55 - 45,53 39,61	40,08 - 44,70 42,48
5	35,93 - 45,05 40,38	39,63 - 40,8 40,24	33,25 - 49,68 39,88	39,20 - 42,33 40,27
6	38,78 - 41,20 39,70	35,73 - 43,25 40,43	36,25 - 47,45 41,53	38,25 - 49,60 43,88
7	35,83 - 41,5 38,16	39,93 - 41,48 40,57	40,25 - 41,75 41,03	37,90 - 46,18 41,06
8	35,63 - 40,9 38,23	41,30 - 43,35 42,03	36,58 - 45,00 39,53	37,85 - 44,25 40,98
9	35,95 - 41,43 38,68	36,23 - 45,03 41,98	38,25 - 50,6 42,66	39,35 - 49,85 45,82
10	40,00 - 44,30 41,53	36,50 - 49,40 44,87	34,20 - 52,80 41,50	40,50 - 49,80 44,17

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Os valores médios da concentração de hemoglobina (g dL^{-1}) obtidos nas quatro combinações avaliadas durante a ozonioterapia (Tabela 2), se mantiveram dentro dos considerados como de referência ($8\text{-}19 \text{ g dL}^{-1}$) para a espécie equina (Schalm *et al.*, 1975; Jain 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997). Ao monitorar estes valores durante o período da ozonioterapia (Figura 2), observa-se uma estabilidade nos valores, não ocorrendo mudanças significativas ao longo do período de aplicação. Entretanto, no final do período de aplicação todos os grupos avaliados mostraram um aumento neste parâmetro hematológico. O grupo de machos tratados com 500 mL de ozônio apresentou os valores mais baixos em relação aos demais grupos, desde o início até o final do período de aplicação, porém sempre mantendo-os dentro dos limites normais para a espécie. As fêmeas tratadas tanto com 500 como com 1000 mL de ozônio mantiveram valores de hemoglobina

mais altos e acima do limite médio de controle. Já os machos tratados com 1000 mL mostraram valores de hemoglobina próximos ao limite médio.

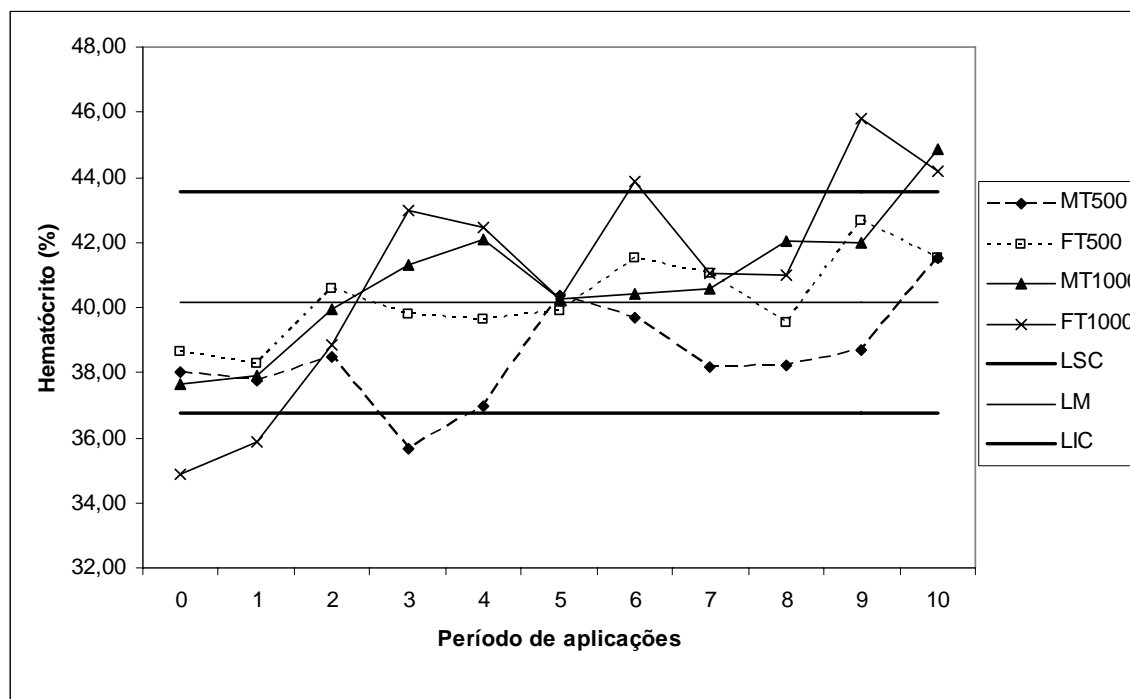


FIGURA 1 – Estimativas do hematócrito (%) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

As discretas alterações observadas foram provavelmente devido à ação do ozônio, já que não poderia ser decorrente de uma atividade física mais intensa que, segundo a literatura científica (Pérez *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2000; Householder & Douglas 2005; Stoiber *et al.*, 2005) é uma das causas do aumento na concentração de hemoglobina pela demanda de uma maior concentração de oxigênio, já que neste estudo houve padronização do exercício físico realizado durante todo o período experimental. Sob condições de exercício, pode aumentar a concentração de oxigênio circulante, o que está relacionado com o aumento na concentração da hemoglobina (Mancini *et al.*, 2003). É possível que a ozonioterapia também melhore a distribuição do oxigênio no organismo, mediante o incremento na concentração de hemoglobina.

TABELA 2 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de hemoglobina (g dL^{-1}) em equinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	7,30 – 10,10 9,10	9,30 – 10,40 9,90	9,90 – 13,1 11,07	9,00 – 11,40 10,13
1	8,45 – 10,35 9,37	8,80 – 10,43 9,73	9,60 – 12,63 10,69	8,78 – 11,48 10,09
2	8,40 – 10,43 9,21	9,33 – 10,90 10,33	9,40 – 13,05 10,92	9,08 – 11,18 10,13
3	8,10 – 10,28 9,25	9,28 – 10,93 10,23	9,45 – 11,93 10,53	9,68 – 11,68 10,49
4	8,48 – 10,28 9,28	8,95 – 11,05 10,10	9,15 – 11,88 10,21	8,95 – 11,15 10,33
5	8,53 – 10,18 9,19	9,00 – 10,43 9,91	9,65 – 12,50 10,73	8,60 – 11,20 10,19
6	8,25 – 10,65 9,34	9,48 – 11,15 10,48	9,48 – 11,95 10,63	9,05 – 11,93 10,48
7	8,63 – 9,93 9,08	9,03 – 10,20 9,76	10,30 – 11,2 10,62	9,18 – 11,63 10,53
8	8,53 – 9,98 9,13	9,08 – 11,00 10,23	9,65 – 11,28 10,22	9,10 – 11,78 10,69
9	8,83 – 10,63 9,51	9,10 – 11,43 10,48	9,95 – 11,65 10,53	9,78 -12,13 11,13
10	8,60 – 11,30 9,90	8,30 – 12,40 10,87	9,90 – 12,80 11,03	10,20 – 12,10 11,20

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

A concentração média de eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), obtida nos animais durante as aplicações do ozônio (Tabela 3), encontrou-se dentro dos valores referenciais ($5,5\text{-}13 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) para a espécie equina (Schalm *et al.*, 1975; Jain 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997). No entanto, se evidencia uma tendência geral de aumento dos valores médios na concentração deste parâmetro nas quatro combinações estudadas (Figura 3).

Quando os machos foram tratados com 500 mL da mistura do gás, apresentaram uma queda nos valores médios de eritrócitos com a terceira aplicação, porém estes valores retornaram para próximos aos do valor médio de controle e alcançaram uma relativa estabilidade posteriormente. Quando tratados com a maior dose (1000 mL) responderam com um discreto aumento, no entanto estes valores foram inferiores ao valor médio calculado. Quando foram as fêmeas que receberam a menor dose (500 mL), estas apresentaram valores mais estáveis e próximos aos do

limite superior de controle (LSC), diferente de quando receberam 1000 mL, quando responderam com aumento mais evidente até o final do período experimental. As fêmeas tratadas com ambas as doses apresentaram os valores médios na concentração de eritrócitos maiores quando comparadas com os valores médios obtidos nos machos durante todo o período de aplicação da mistura do gás.

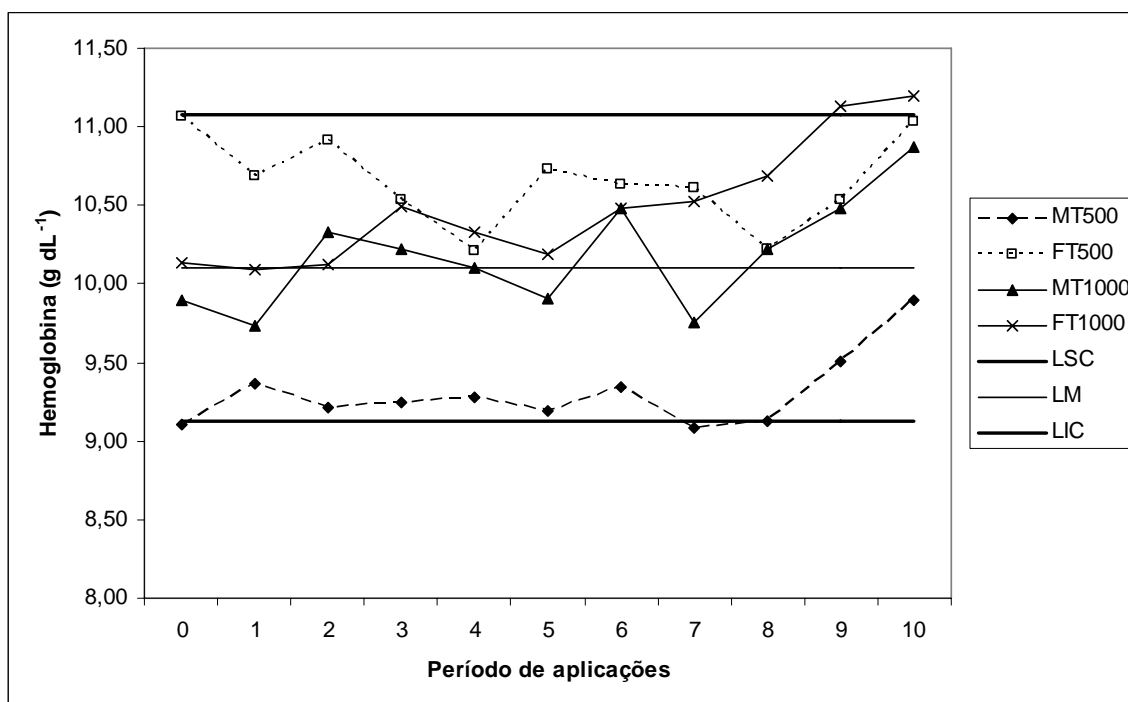


FIGURA 2 – Estimativas da hemoglobina (g dL^{-1}) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Apesar de Schalm *et al.* (1975) relatar que fêmeas de raça Quarto de Milha podem apresentar valores médios na concentração de parâmetros da linha vermelha (entre eles os eritrócitos) maiores que os dos machos da mesma raça, é visível a diferença da resposta à ozonioterapia entre machos e fêmeas, sendo as últimas mais responsivas às aplicações de ozônio, conseguindo valores mais altos na contagem de eritrócitos independente da quantidade da mistura do gás utilizada. Adicionalmente, diferente do mencionado por Schalm e colaboradores em 1975, Moran & Araya

(2003) relataram que, sob condições normais, seria mais comum encontrar valores maiores na concentração de eritrócitos nos machos, por estímulo da testosterona sobre a eritropoiese. Esta informação reforça o efeito da ozonioterapia encontrado nas fêmeas deste estudo.

TABELA 3 – Valores mínimos, máximos e médios dos eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	7,16 – 8,59 7,66	6,90 – 7,83 7,40	8,97 – 9,98 9,32	6,51 – 8,96 7,44
1	7,14 – 7,91 7,55	6,89 – 7,75 7,26	8,53 – 9,39 9,04	6,88 – 9,49 7,77
2	7,00 – 8,72 7,90	7,43 – 8,43 7,84	8,02 – 10,25 9,24	7,76 – 9,27 8,36
3	6,23 – 8,55 7,26	7,81 – 8,11 7,92	8,87 – 9,16 9,04	7,55 – 11,15 8,99
4	6,55 – 8,92 7,61	8,00 – 8,73 8,26	8,66 – 9,89 9,31	9,03 – 9,84 9,38
5	7,45 – 8,85 8,37	7,57 – 8,73 8,08	8,89 – 10,76 9,55	7,96 – 10,16 8,81
6	7,65 – 8,80 8,10	7,34 – 8,35 7,91	9,12 – 10,07 9,53	7,77 – 11,71 9,46
7	7,15 – 8,82 7,74	7,73 – 8,45 8,00	8,90 – 10,06 9,57	7,78 – 9,63 8,88
8	7,22 – 8,13 7,80	7,86 – 8,78 8,42	8,74 – 9,57 9,26	7,87 – 10,62 9,01
9	6,88 – 8,88 7,85	7,32 – 8,42 8,00	8,86 – 10,87 9,64	7,69 – 11,85 9,81
10	7,72 – 9,14 8,29	7,61 – 9,81 8,61	7,80 – 11,58 9,56	8,77 – 10,54 9,88

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Ao longo do experimento, os animais não foram submetidos a outras atividades ou esforços superiores aos que estavam condicionados a trabalhar, adicionalmente os encarregados do manejo dos animais durante as atividades experimentais foram os mesmos durante todo o período experimental, inclusive não foram presenciadas alterações climáticas. Deste modo, se descarta a possibilidade de que o possível aumento nos valores dos eritrócitos, assim como do hematócrito, seja

devido a fatores mencionados pela literatura científica como estresse, medo, atividades para as quais os animais não estavam habituados ou por mudanças climáticas que pudessem alterar estes parâmetros (Gill & Wanska, 1978; Pérez *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2000; Householder & Douglas 2005), decorrentes de uma contração esplênica. Acredita-se realmente que foi devido ao efeito exercido pela ação de várias aplicações do ozônio.

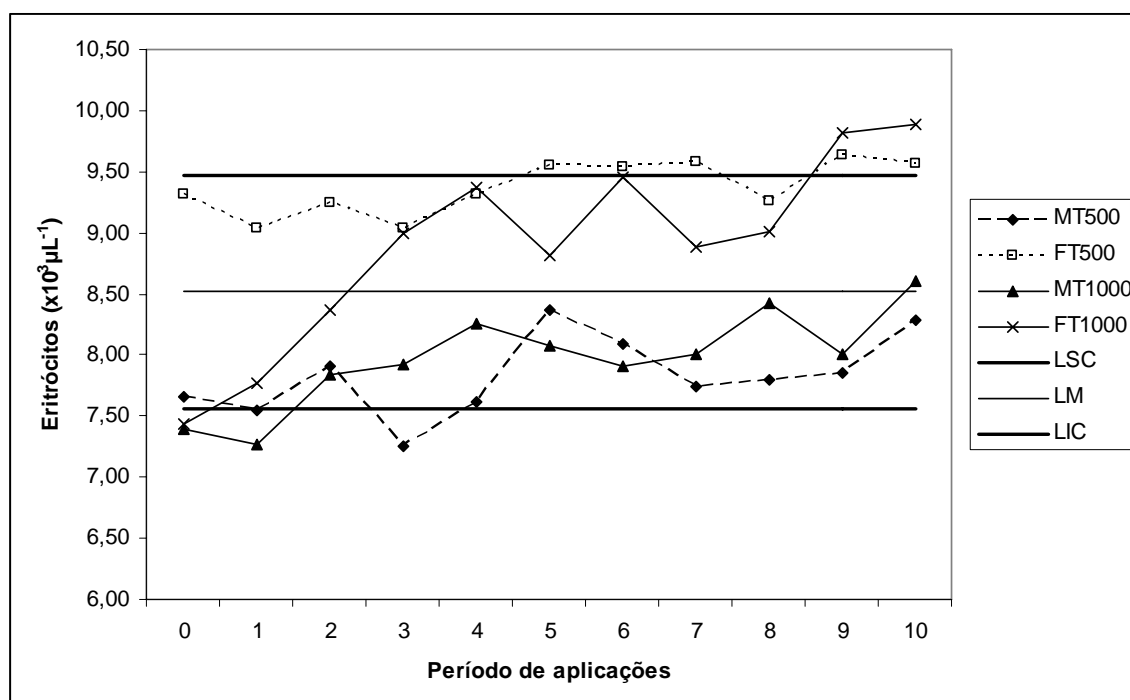


FIGURA 3 – Estimativas de eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Os valores médios da contagem de leucócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) obtidos nos animais durante as aplicações de ozônio (Tabela 4), encontraram-se dentro dos limites referenciais ($5,4\text{-}14,3$ leucócitos $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) para a espécie equina (Schalm *et al.*, 1975; Jain 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997).

Durante a fase inicial do período de aplicação da mistura do gás, os machos responderam de maneira estável quando receberam a menor dose (500 mL) e de forma

mais variável quando receberam 1000 mL da mistura do gás, inclusive ambos, os grupos de machos, com aumento na concentração deste parâmetro após a sétima e sexta aplicação, respectivamente. Além disso, os machos quando tratados com 500 mL de ozônio, apresentaram em geral, valores médios inferiores na concentração de leucócitos (Figura 4) em relação aos outros grupos em estudo. As fêmeas que receberam a mesma dosagem (500 mL) apresentaram inicialmente os valores médios mais altos e na sua maioria estes valores foram superiores ao do limite médio (LM) quando comparados com os valores médios deste parâmetro nos equínos das outras combinações avaliadas (MT500, MT1000 e FT1000), exceto no sétimo e oitavo períodos de aplicação da mistura do gás, onde os machos que receberam 1000 mL as superaram. Adicionalmente, este grupo (FT500) demonstrou um decréscimo nos valores médios particularmente após a terceira aplicação, que se estabilizaram até a oitava aplicação da mistura do gás.

TABELA 4 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de leucócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em equínos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	4,60 – 9,00 7,40	6,00 – 8,50 7,20	8,80 – 13,90 10,60	6,30 – 9,40 7,90
1	5,63 – 9,18 7,54	6,40 – 8,73 7,83	8,18 – 11,00 9,37	6,60 – 9,03 7,80
2	5,6 – 8,95 7,70	7,53 – 10,68 8,63	9,80 – 10,63 10,09	6,70 – 9,08 8,04
3	5,73 – 8,70 7,43	6,38 – 8,95 7,48	8,05 – 10,15 9,14	7,1 – 9,20 8,28
4	6,08 – 8,68 7,59	7,55 – 9,23 8,26	7,73 – 9,68 8,65	6,67 – 8,88 8,09
5	5,45 – 9,88 7,42	6,35 – 8,40 7,68	7,85 – 9,75 9,03	6,80 – 8,65 7,57
6	5,50 – 8,73 6,83	6,63 – 10,20 8,14	7,70 – 10,53 8,98	7,55 – 9,98 8,85
7	5,83 – 9,48 7,67	6,18 – 14,53 9,85	8,50 – 9,40 9,04	7,35 – 8,68 8,17
8	6,03 – 10,4 7,99	6,23 – 11,25 8,83	7,48 – 10,25 8,63	7,23 – 9,4 8,03
9	5,53 – 11,35 7,76	6,30 – 12,73 9,21	8,98 – 10,70 9,61	7,35 – 9,85 8,48
10	6,8 – 11,8 8,47	6,40 – 11,30 8,83	7,20 – 11,30 9,20	7,6 – 9,50 8,50

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

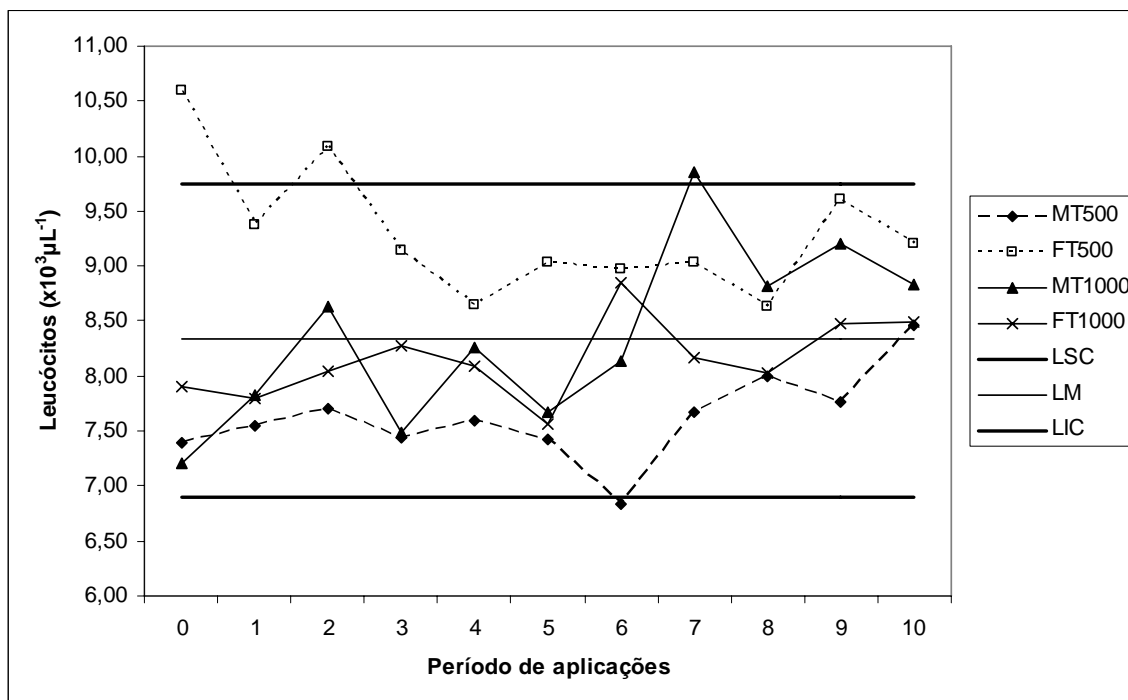


FIGURA 4 – Estimativas de leucócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Apesar da variabilidade na concentração dos leucócitos totais observada quando os machos receberam 1000 mL da mistura do gás, observou-se que na fase final do período experimental, houve um aumento pronunciado, o que provavelmente pode ter sido decorrente de um ferimento sofrido por um dos indivíduos do grupo. Ainda assim o efeito de aumento tardio dos valores médios de leucócitos pode ser observado em todos as combinações avaliadas neste estudo. A maioria dos valores médios obtidos com a aplicação de 1000 mL da mistura do gás nas fêmeas foram menores que as do limite médio calculado, porém no final, apreciaram-se valores discretamente acima dessa média.

Valores mais altos de leucócitos são comumente encontrados nas fêmeas e se devem, em geral, à concentração de neutrófilos segmentados e linfócitos (Jain, 1993). Por outro lado, sabe-se que a contagem de leucócitos totais aumenta em processos inflamatórios, porém também está descrito que a ozonioterapia pode promover leucocitose com ativação do sistema imune por melhorar o sistema fagocitário, pela

ação bactericida dos leucócitos e pela produção de imunoglobulinas (Terasaki *et al.*, 2001). Entretanto Ohtsuka *et al.* (2006), mencionaram ausência de variação na contagem dos leucócitos totais após autohemotransfusão ozonizada em vacas com doença inflamatória. Na opinião dos autores mais do que uma resposta imune celular, a ozonioterapia acarreta uma resposta do tipo humoral e, conseqüentemente, células específicas da linhagem branca podem ser mais frequentemente estimuladas. Adicionalmente, segundo os autores, este tipo de resposta à ozonioterapia pode diferir quando aplicada em animais sadios e em animais sob processo inflamatório. Devido a variabilidade encontrada com relação ao comportamento na contagem dos leucócitos totais em estudos científicos anteriores e na presente pesquisa, fica demonstrado a necessidade de novos experimentos na área, particularmente pelo fato da ozonioterapia estar sendo utilizada na medicina veterinária, pelo seu efeito positivo em processos inflamatórios para o tratamento de metrite e retenção de placenta (Scrollavezza *et al.*, 1997), mastite (Ogata & Nagahata, 2000), flegmão interdigital agudo (Scrollavezza *et al.*, 2002) em vacas leiteiras e no tratamento de dor lombar em eqüinos (Vigliani *et al.*, 2005).

Alguns dos valores médios da contagem de segmentados, obtidos nos animais durante as aplicações de ozônio (Tabela 5), encontraram-se discretamente acima daqueles considerados de referência (2,26-4,75 segmentados $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) para a espécie eqüina (Schalm *et al.*, 1975; Jain 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997). A exceção de um animal que apresentou um ferimento no final do período experimental, os demais se mostraram aparentemente sadios durante todo o experimento. O maior valor encontrado no grupo dos machos tratados com 1000 mL da mistura do gás (MT1000) foi possivelmente decorrente do ferimento, anteriormente mencionado em um dos animais do grupo.

Apesar das oscilações na contagem dos segmentados, existiu uma tendência a um aumento na segunda metade do período de aplicação de ozônio (Figura 5), com posterior redução, inclusive tendo transcorrido três dias após o término da aplicação do ozônio (período 10, Figura 5). Quando aplicados 1000 mL da mistura do gás, tanto as fêmeas como os machos apresentaram valores médios acima do limite médio e superior de controle, na segunda metade do período das aplicações, porém com redução subseqüente até o final do experimento.

TABELA 5 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em equinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	3,31 – 5,59 4,64	1,98 – 3,98 3,24	3,48 – 4,46 4,20	2,08 – 5,04 3,79
1	4,15 – 4,91 4,56	2,56 – 5,28 4,27	2,35 – 4,08 3,15	3,50 – 4,88 4,36
2	3,74 – 4,92 4,15	3,63 – 5,41 4,39	2,82 – 5,90 4,15	4,24 – 4,72 4,46
3	3,83 – 4,41 4,08	3,74 – 4,05 3,86	2,81 – 3,76 3,27	4,78 – 5,42 5,01
4	3,82 – 4,98 4,46	4,26 – 5,12 4,71	3,07 – 4,55 3,77	3,46 – 4,98 4,39
5	3,90 – 4,57 4,13	3,21 – 4,94 4,17	3,26 – 5,53 4,38	3,73 – 4,40 4,11
6	3,60 – 3,92 3,74	4,12 – 6,07 5,11	3,81 – 5,15 4,30	5,13 – 6,70 6,11
7	4,30 – 5,14 4,81	4,14 – 10,17 6,72	4,38 – 4,70 4,52	4,52 – 5,68 5,14
8	4,34 – 5,69 4,92	4,16 – 7,37 5,93	3,90 – 4,09 3,97	3,94 – 5,59 4,91
9	3,66 – 5,65 4,44	3,13 – 8,14 5,41	2,70 – 4,82 3,95	3,86 – 5,42 4,86
10	4,08 – 5,44 5,25	3,20 – 9,27 5,27	2,23 – 3,91 3,01	3,57 – 5,04 4,45

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

O aumento destas células na circulação sanguínea ocorre como resposta a vários fatores, entre eles a taxa de granulocitopoiese; a liberação a partir da medula óssea; liberação da reserva marginal; vida média destas células e a sua migração aos diferentes tecidos (Jain, 1993). A secreção aumentada de epinefrina, devido ao estresse e à atividade física prolongada ou intensa pode causar neutrofilia, principalmente por liberação de células do pool marginal. Entretanto, os equinos do presente estudo mostraram-se bastante tranqüilos durante a ozonioterapia, pelo que se acredita que este aumento na contagem dos neutrófilos seja decorrente do estímulo direto sobre a medula óssea, tal como mencionado por Remigio *et al.* (1999).

Os neutrófilos entram na circulação a partir da medula óssea, sendo a meia vida vascular destas células entre 7 e 14 horas, em diferentes espécies animais e humanos, para em seguida passarem aos tecidos (Jain, 1993). Assim, o aumento total observado destas células na corrente sanguínea foi provavelmente decorrente da

ozonioterapia, realizada a cada três dias, e o seu efeito sobre a medula óssea. Também foi observada uma maior resposta quando utilizada uma maior dose de ozônio nos equinos, o que sugere uma resposta ao ozônio do tipo dose-dependente. Esta resposta ao ozônio com diferentes tipos de células, tem sido descrita na literatura científica (Bocci, 1994a; Plopper *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1994; Valacchi & Bocci, 1999; Deaton *et al.*, 2005).

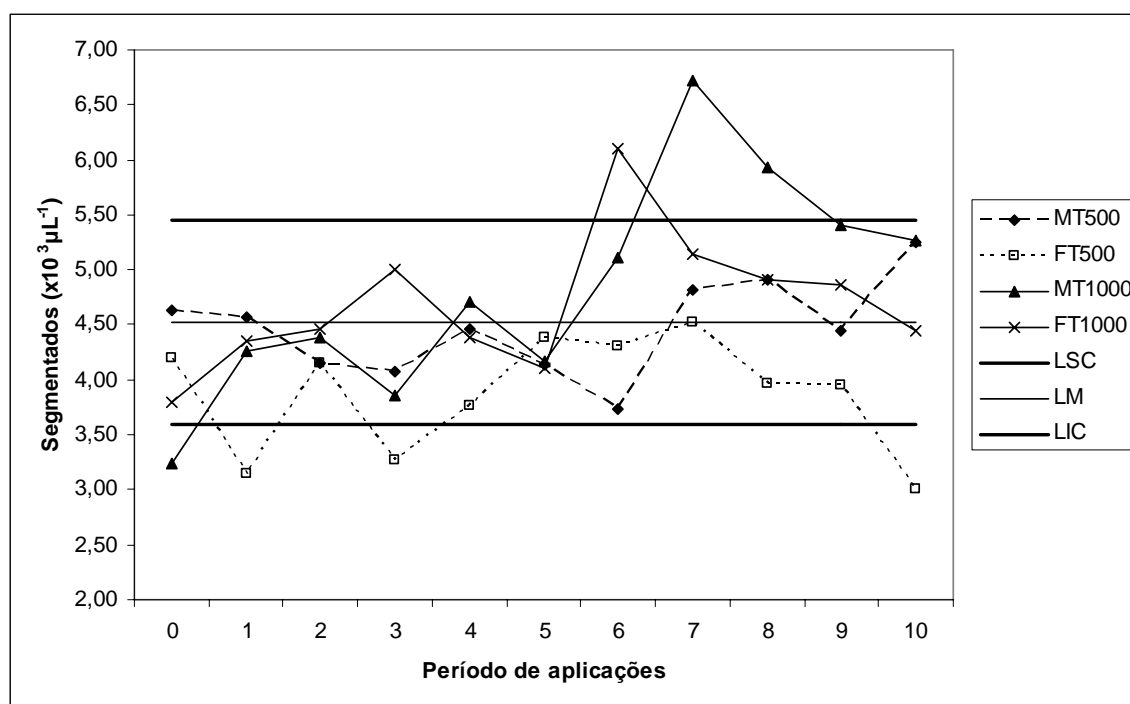


FIGURA 5 – Estimativas de segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Bocci (1994a) menciona que o efeito do ozônio sobre os PMNs, se deve ao aumento na atividade fagocitária mediante estímulo direto do ozônio sobre estas células para produção e/ou liberação de citocinas ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e IL-8) ou mesmo estas citocinas liberadas estimulam mais células, para potencializar a possível resposta imune celular e/ou humoral. Entretanto, segundo o autor deve-se ter cautela, já que em altas concentrações, o ozônio pode apresentar um efeito deletério.

Os resultados obtidos sugerem que o ozônio estimula a primeira linha de defesa orgânica (segmentados) sendo, no entanto, necessárias várias aplicações para se conseguir este estímulo, o que reforça o efeito acumulativo da ozonioterapia, mencionada na literatura científica (Bocci, 1994a; Plopper *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1994; Valacchi & Bocci, 1999; Deaton *et al.*, 2005).

Os valores médios da concentração de bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) obtidos nos animais durante as aplicações de ozônio (Tabela 6), encontraram-se dentro dos considerados de referência ($0-0,1 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) para a espécie equina (Schalm *et al.*, 1975; Jain 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997).

Os bastonetes (Figura 6) mostraram uma tendência peculiar em todos os equinos avaliados, que apresentaram a partir da primeira aplicação do ozônio um aumento na concentração dessas células e depois de certo número de aplicações, os valores médios diminuíram, oscilaram e finalmente se aproximam dos iniciais, quando cessou a aplicação da mistura do gás.

Os machos quando receberam 500 mL da mistura do gás mostraram valores médios abaixo do limite médio, a exceção de quando foi administrada a quarta aplicação. Já as fêmeas com a mesma dose, mostraram valores médios acima do limite médio de controle, entre a segunda e quinta aplicação. Os equinos que receberam a maior quantidade de ozônio (1000 mL), apresentaram valores médios com maiores diferenças entre si, superando inclusive o limite de controle superior.

Os bastonetes são formas imaturas de neutrófilos (Jain, 1993) e o seu aparecimento na corrente sanguínea nos equinos do estudo, se deve possivelmente a intensificação na produção celular pela medula óssea, o que pode ser decorrente de uma ação direta do ozônio sobre este órgão granulocitopoiético. O rápido aumento na concentração de bastonetes particularmente ao se utilizar a dose mais elevada do ozônio, sugere uma resposta dose-dependente, tal como descrito por outros autores em diferentes espécies (Bocci, 1994a; Plopper *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1994; Valacchi & Bocci, 1999; Deaton *et al.*, 2005).

Os valores médios da concentração dos linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) obtidos durante as aplicações do ozônio nos animais (Tabela 7), encontraram-se dentro dos considerados de referência ($1,5-7,7 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) para a espécie equina (Schalm *et al.*, 1975; Jain, 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997).

TABELA 6 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em equinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	0,00 – 0,00 0,00	0,00 – 0,00 0,00	0,00 – 0,14 0,04	0,00 – 0,00 0,00
1	0,000 – 0,028 0,009	0,000 – 0,022 0,013	0,000 – 0,037 0,012	0,000 – 0,045 0,015
2	0,000 – 0,043 0,019	0,027 – 0,169 0,110	0,027 – 0,122 0,074	0,017 – 0,091 0,057
3	0,000 – 0,098 0,042	0,053 – 0,096 0,080	0,025 – 0,115 0,067	0,115 – 0,192 0,162
4	0,043 – 0,120 0,085	0,019 – 0,046 0,035	0,048 – 0,150 0,092	0,034 – 0,155 0,092
5	0,017 – 0,041 0,028	0,021 – 0,238 0,135	0,059 – 0,073 0,068	0,000 – 0,054 0,024
6	0,000 – 0,11 0,042	0,000 – 0,414 0,164	0,000 – 0,058 0,027	0,000 – 0,135 0,062
7	0,000 – 0,058 0,019	0,000 – 0,066 0,034	0,023 – 0,085 0,044	0,000 – 0,037 0,012
8	0,000 – 0,060 0,037	0,000 – 0,028 0,015	0,000 – 0,041 0,022	0,000 – 0,037 0,012
9	0,000 – 0,041 0,023	0,000 – 0,000 0,000	0,000 – 0,054 0,025	0,000 – 0,025 0,015
10	0,00 – 0,00 0,00	0,00 – 0,00 0,00	0,00 – 0,00 0,00	0,00 – 0,00 0,00

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Ao se monitorar a resposta dos linfócitos à ozonioterapia (Figura 7) observa-se que os valores médios de maneira geral sofreram um decréscimo na fase intermediária do período de aplicação. A exceção das fêmeas que receberam 500 mL da mistura do gás, os valores nesta fase foram inclusive inferiores ao limite médio calculado. Após esta fase de decréscimo, ocorreu um discreto aumento na concentração de linfócitos com as últimas aplicações da mistura do gás.

Ohtsuka *et al.* (2006), detectaram em vacas com processos inflamatórios, um aumento gradativo na população de linfócitos, do tipo auxiliar (CD4^+), depois de realizada autohemotransfusão. Linfocitose também foi descrita por Terasaki *et al.*, (2001) após autohemotransfusão em bezerros, inclusive com incremento na produção de algumas citocinas. Já Bocci (1994b) descreve a ativação discreta de células mononucleares *ex vivo* em humanos com o vírus da imunodeficiência adquirida,

esclarecendo a possibilidade de ativação de linfócitos para a modulação do sistema imune, inclusive com baixo risco de toxicidade.

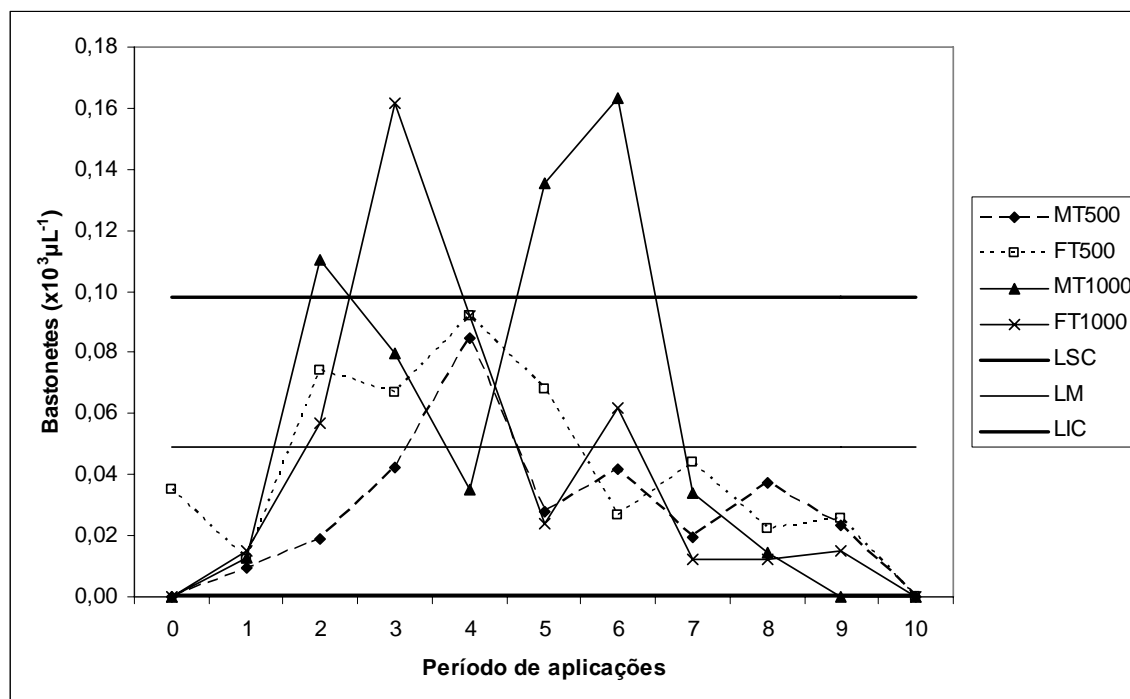


FIGURA 6 – Estimativas de bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Após administração do ozônio, foi observado que alguns linfócitos apresentavam granulações azurófilas sugestivas de células Natural Killer (NK) (Figura 8). Uma vez constatado este achado, foi verificada a sua frequência durante o período de aplicações da mistura do gás (Figura 9) nos quatro grupos estudados.

O monitoramento da presença dessas células com granulações azurofílicas durante as nove aplicações do azônio revelou uma diminuição progressiva na sua frequência de aparecimento até a quinta aplicação da mistura do gás, porém após o sétimo período, observou-se um aumento em todos os grupos de equinos sob avaliação.

TABELA 7 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	1,15 – 3,87 2,34	2,84 – 3,74 3,36	3,73 – 10,15 5,83	2,40 – 4,42 3,45
1	1,22 – 4,06 2,61	2,99 – 3,47 3,21	4,29 – 8,36 5,82	2,22 – 3,97 2,90
2	1,30 – 4,83 3,06	1,89 – 6,32 3,56	4,38 – 6,57 5,49	1,98 – 3,86 3,15
3	1,26 – 4,48 2,82	2,04 – 4,30 2,98	3,76 – 6,55 5,44	1,63 – 3,80 2,55
4	1,06 – 4,51 2,59	2,32 – 3,37 2,98	3,27 – 6,22 4,38	2,52 – 3,39 2,96
5	1,07 – 4,67 2,63	2,46 – 2,88 2,67	3,28 – 4,63 4,02	1,73 – 3,57 2,61
6	1,35 – 4,60 2,60	1,71 – 2,98 2,22	3,13 – 5,97 4,14	1,76 – 2,67 2,12
7	1,18 – 3,91 2,31	1,82 – 3,01 2,38	3,21 – 4,39 3,78	2,33 – 3,12 2,60
8	1,11 – 4,06 2,39	1,88 – 2,78 2,23	3,14 – 5,97 4,16	1,89 – 3,45 2,67
9	1,09 – 5,19 2,80	2,65 – 3,91 3,18	3,64 – 7,41 5,02	2,35 – 3,82 3,06
10	1,09 – 5,78 2,71	1,47 – 3,96 2,97	4,39 – 8,36 5,83	2,89 – 3,42 3,09

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Entre os eqüinos que receberam 500 mL, os machos mostraram valores maiores quando comparados com as fêmeas. Quando a dose aplicada nos eqüinos foi de 1000 mL da mistura do gás, entre a terceira e sexta aplicação, os valores porcentuais destas células se mantiveram similares entre fêmeas e machos, para logo após a sétima aplicação as fêmeas virem a apresentar valores médios mais elevados.

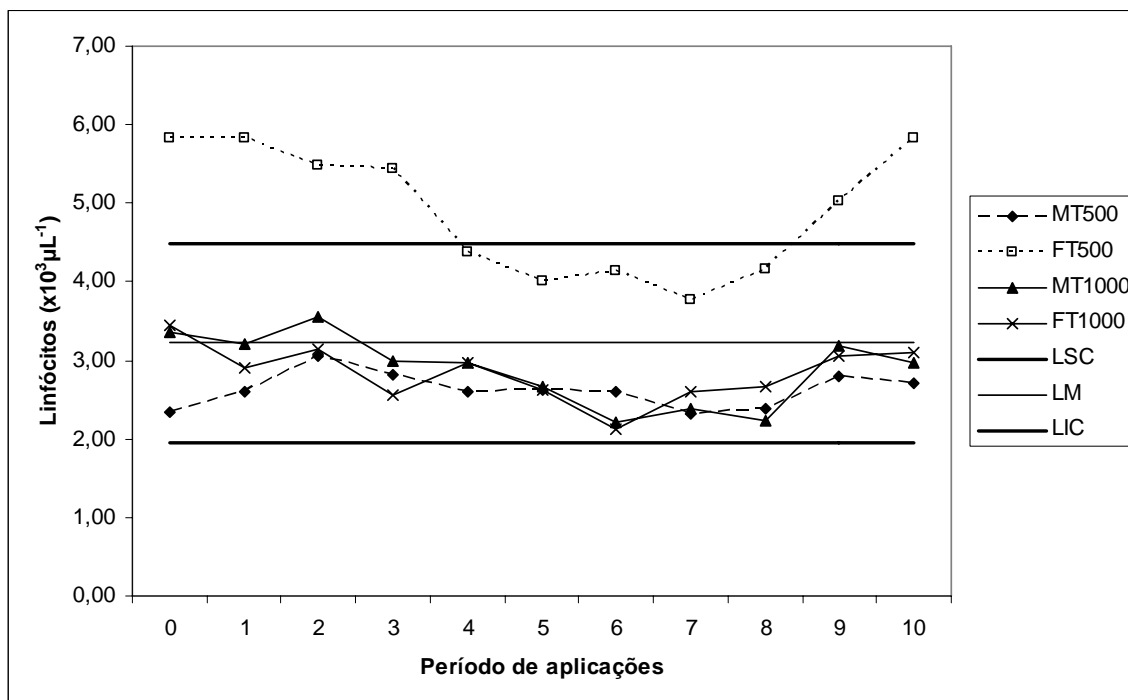


FIGURA 7 – Estimativas de linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

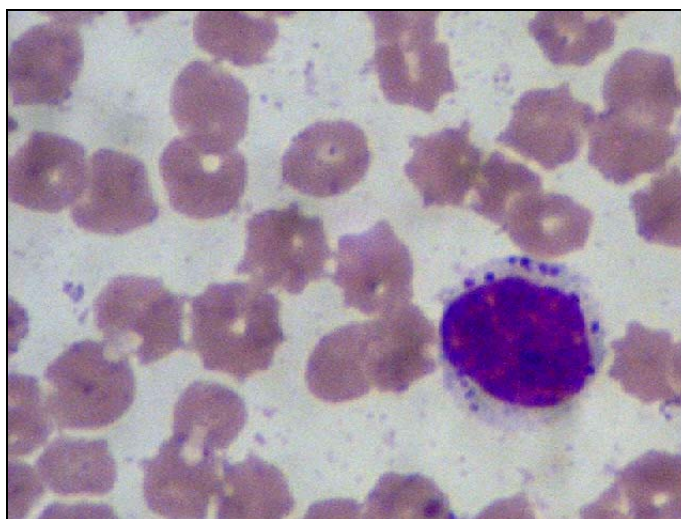


FIGURA 8 – Linfócito com granulações azurófilas detectado durante o período de aplicação do ozônio.

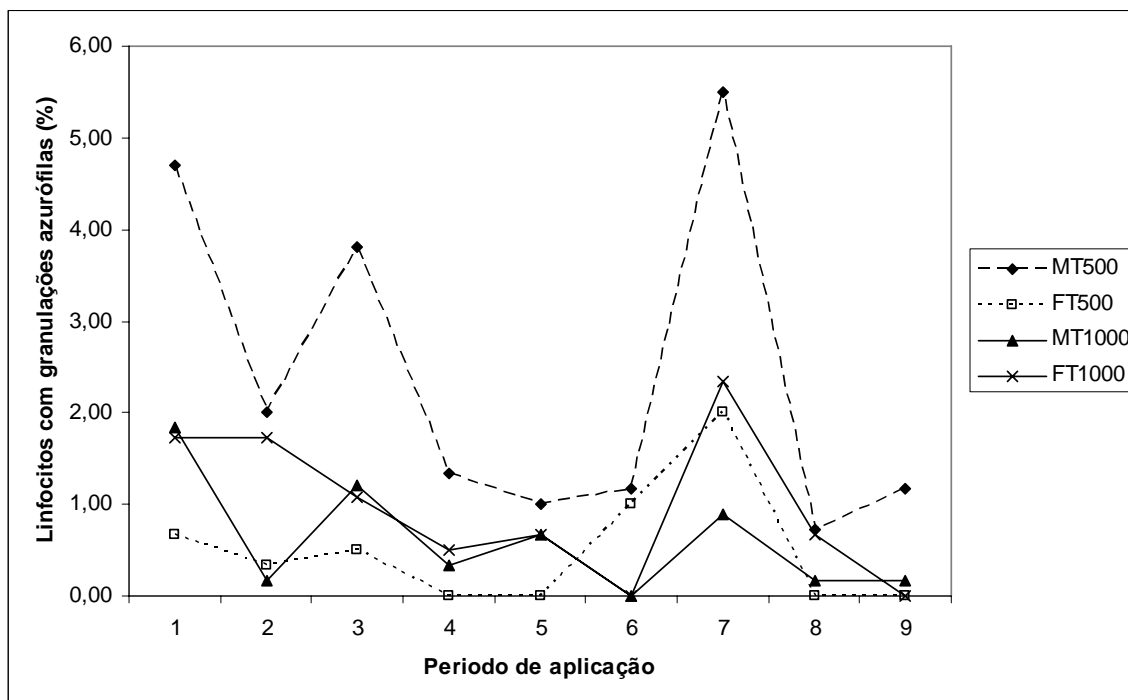


FIGURA 9 – Estimativas da frequência de linfócitos com granulações azurófilas (%) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação do ozônio (Aplicações 1-9).

O aparecimento dessas granulações pode estar associado ao estímulo dos produtos de reação do ozônio sobre a medula óssea, sendo este um dos locais de origem destas células. A atividade citotóxica mediada por linfócitos, envolve a ativação de células do tipo T (antígeno-dependentes) e ativação de células NK. Estas células da imunidade inata (inespecífica) e que se caracterizam morfológicamente por apresentarem granulações azurófilas no seu citoplasma, possuem a capacidade de poder agir sobre células infectadas, através das enzimas contidas nestas granulações (Jain, 1993). Villarrubia *et al.*, (1996) compararam a ativação de linfócitos NK entre humanos não infectados e infectados por *Leishmania aethiopica*, onde os primeiros apresentaram ativação destas células após estímulo de citocinas derivadas de linfócitos B.

Este achado também sugere que o ozônio ativa mecanismos de reconhecimento na membrana celular, alertando o sistema imune innato, demonstrado pela presença destas células. É importante destacar, no entanto que, segundo Ohtsuka *et al.* (2006), a resposta à ozonioterapia em animais sadios é mais de caráter humoral,

diferente da resposta observada em animais com processos inflamatórios, que é particularmente do tipo celular.

Os valores médios na concentração dos monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) obtidos durante as aplicações do ozônio nos animais (Tabela 8), encontraram-se dentro dos considerados de referência ($0-1 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) para a espécie eqüina (Schalm *et al.*, 1975; Jain, 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997).

TABELA 8 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	0,00 – 0,34 0,12	0,07 – 0,26 0,17	0,00 – 0,46 0,18	0,00 – 0,50 0,24
1	0,06 – 0,20 0,12	0,11 – 0,18 0,14	0,11 – 0,30 0,18	0,05 – 0,26 0,15
2	0,09 – 0,20 0,15	0,06 – 0,59 0,28	0,02 – 0,25 0,13	0,05 – 0,25 0,17
3	0,12 – 0,22 0,17	0,10 – 0,37 0,25	0,12 – 0,18 0,14	0,18 – 0,28 0,22
4	0,07 – 0,14 0,10	0,17 – 0,23 0,21	0,12 – 0,26 0,19	0,13 – 0,30 0,23
5	0,07 – 0,25 0,16	0,10 – 0,33 0,25	0,17 – 0,37 0,24	0,09 – 0,20 0,15
6	0,14 – 0,25 0,21	0,15 – 0,23 0,18	0,17 – 0,32 0,23	0,05 – 0,18 0,11
7	0,10 – 0,31 0,19	0,02 – 0,65 0,25	0,19 – 0,25 0,22	0,13 – 0,15 0,13
8	0,11 – 0,42 0,27	0,05 – 0,34 0,16	0,02 – 0,29 0,13	0,04 – 0,14 0,10
9	0,11 – 0,20 0,15	0,09 – 0,32 0,18	0,04 – 0,43 0,20	0,04 – 0,22 0,11
10	0,07 – 0,35 0,17	0,09 – 0,57 0,27	0,00 – 0,50 0,25	0,17 – 0,30 0,23

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Observa-se na Figura 10 um comportamento bastante variável na concentração dos monócitos durante todo o período de aplicação do ozônio. Tanto nos machos como nas fêmeas tratados com 500 mL da mistura do gás, (MT500 e FT500) existiu uma tendência a aumentar a concentração dos monócitos até a oitava e quinta aplicação, respectivamente. A resposta observada nos machos tratados com 1000 mL,

apesar de variável, ocasionou valores médios acima do limite médio calculado (Figura 10). As fêmeas que receberam a maior dose (1000 mL) responderam com uma diminuição ao receberem a primeira aplicação da mistura do gás, apresentando depois um aumento na concentração dos monócitos até o quarto período de aplicação, sendo que, posteriormente, apresentaram valores médios em decréscimo até o término do período experimental. Ao retirar a aplicação do ozônio, os valores médios na concentração de monócitos aumentaram em todos os grupos em estudo.

Ao se monitorar a concentração dos monócitos frente à administração de diferentes doses da mistura do gás, nota-se um aumento mais rápido na quantidade dessas células depois de administrada a maior dose, ou seja, 1000 mL, o que sugere o efeito dose-dependente descrito na literatura científica (Bocci, 1994a; Plopper *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1994; Valacchi & Bocci, 1999; Deaton *et al.*, 2005).

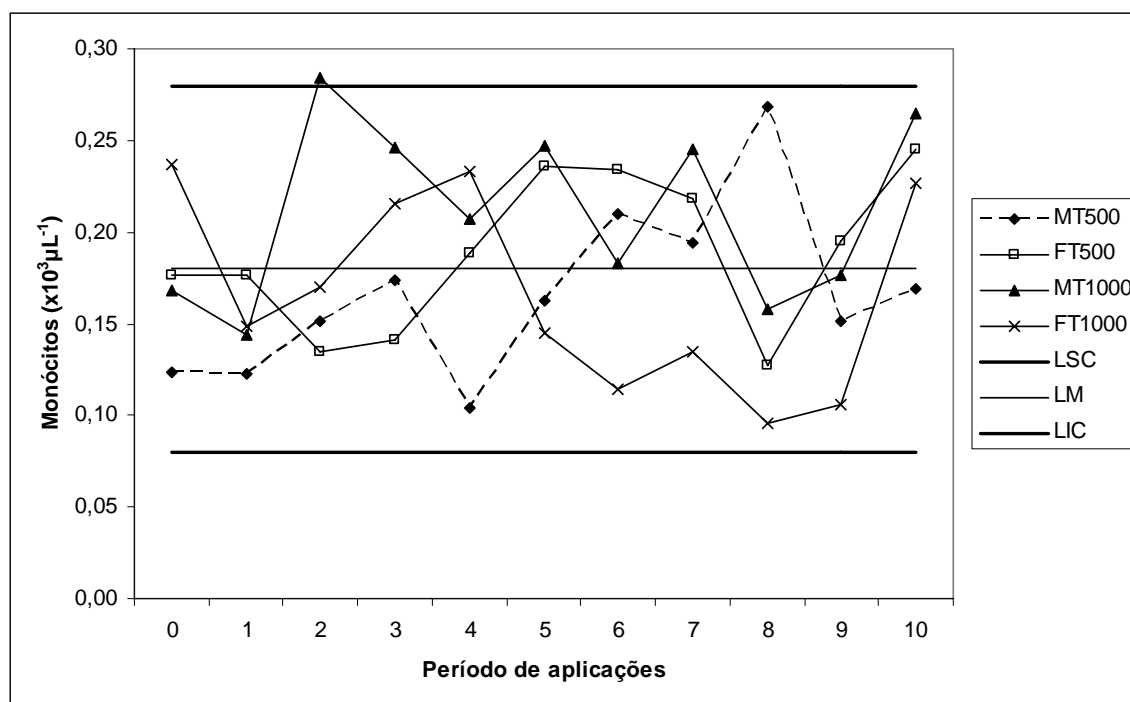


FIGURA 10 – Estimativas de monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Os valores médios da concentração dos basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) obtidos durante as aplicações de ozônio nos animais (Tabela 9), encontraram-se dentro dos considerados de referência ($0-0,29 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) para a espécie equina (Schalm *et al.*, 1975; Jain, 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997).

A exceção dos machos tratados com 500 mL da mistura do gás, que inicialmente (até o quinto período de aplicação) apresentaram um aumento discreto na concentração dos basófilos (Figura 11), os demais animais apresentaram diminuição na concentração destas células. Também pode ser observado que com o avançar das aplicações a concentração deste parâmetro tende a aumentar. Após três dias de haver retirado o ozônio dos animais, os valores médios diminuíram, exceto nas fêmeas que receberam anteriormente 1000 mL da mistura do gás.

TABELA 9 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em equinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	0,00 – 0,09 0,02	0,00 – 0,21 0,14	0,14 – 0,27 0,21	0,00 – 0,32 0,13
1	0,01 – 0,06 0,04	0,04 – 0,09 0,06	0,06 – 0,09 0,07	0,02 – 0,19 0,08
2	0,00 – 0,21 0,10	0,05 – 0,10 0,07	0,00 – 0,05 0,03	0,05 – 0,12 0,08
3	0,03 – 0,26 0,11	0,04 – 0,16 0,10	0,03 – 0,05 0,04	0,05 – 0,11 0,08
4	0,02 – 0,26 0,10	0,10 – 0,15 0,13	0,02 – 0,05 0,03	0,02 – 0,19 0,11
5	0,00 – 0,26 0,12	0,06 – 0,17 0,16	0,02 – 0,07 0,05	0,05 – 0,15 0,10
6	0,02 – 0,07 0,05	0,04 – 0,12 0,09	0,00 – 0,12 0,05	0,07 – 0,10 0,09
7	0,02 – 0,17 0,08	0,04 – 0,15 0,11	0,06 – 0,18 0,11	0,00 – 0,08 0,03
8	0,03 – 0,28 0,14	0,09 – 0,23 0,14	0,06 – 0,08 0,06	0,00 – 0,09 0,04
9	0,00 – 0,19 0,09	0,13 – 0,23 0,18	0,03 – 0,14 0,07	0,04 – 0,19 0,09
10	0,00 – 0,07 0,03	0,00 – 0,19 0,12	0,00 – 0,09 0,03	0,17 – 0,48 0,28

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Ainda não existem relatos sobre a relação específica do ozônio sobre os basófilos. Como estas células também podem ser produzidas na medula óssea (Jain, 1993) e devido ao efeito da ozonioterapia sobre a medula (Remigio *et al.*, 1999), pode haver estímulo no aparecimento dos basófilos no sangue periférico. Também é possível que haja uma associação com antigenicidade, por ser uma das funções dos basófilos. Adicionalmente, sabe-se que a produção de basófilos é antigênico-específica regulada por citocinas específicas produzidas por linfócitos T ativados (Jain, 1993), podendo esta ativação ocorrer devido à exposição ao ozônio.

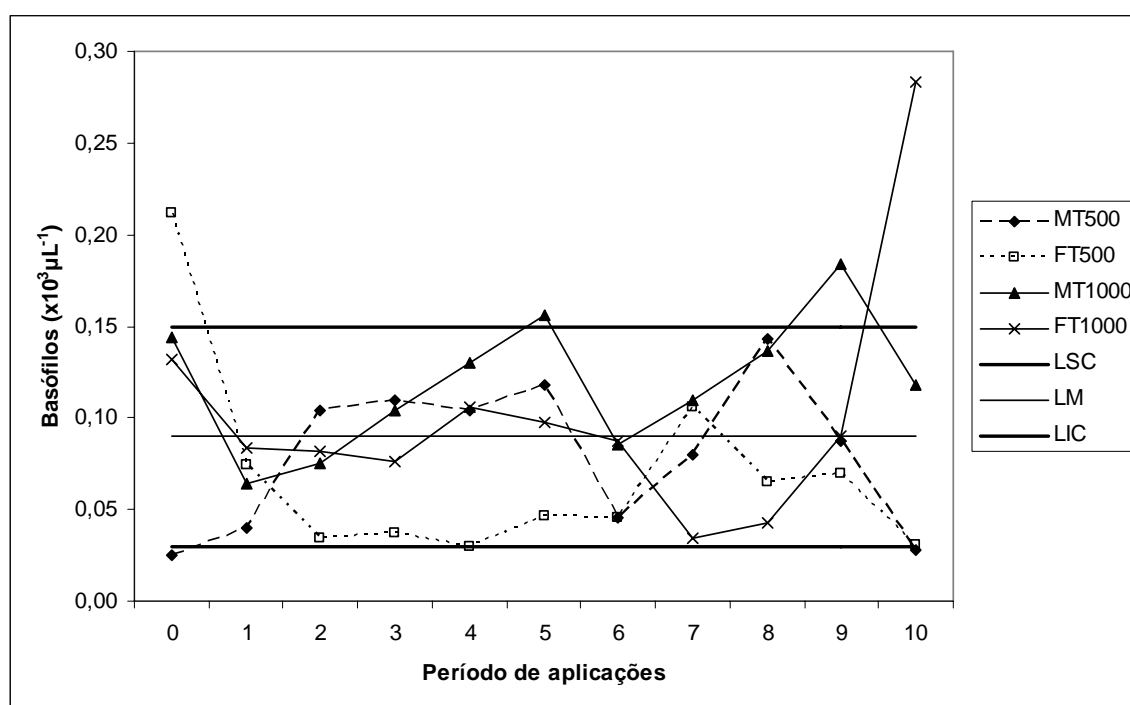


FIGURA 11 – Estimativas de basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Os valores médios da concentração de eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), obtidos nos animais durante as aplicações de ozônio (Tabela10), encontraram-se dentro dos considerados de referência ($0-1 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) para a espécie eqüina (Schalm *et al.*, 1975; Jain, 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997).

Tanto as fêmeas como os machos permaneceram com valores estáveis nas primeiras aplicações do ozônio (exceto FT1000), com discreta diminuição na concentração dos eosinófilos após a segunda aplicação do ozônio, que foi seguida por um aumento na concentração destas células (Figura 12). Quando utilizada a menor dose (500 mL de ozônio), as fêmeas comparadas com os machos que receberam a mesma quantidade da mistura do gás, atingiram valores na concentração de eosinófilos acima do limite médio de controle, com as últimas aplicações do ozônio. Já quando os eqüinos receberam a maior dose (1000 mL), a resposta sobre a concentração dos eosinófilos foi mais evidente, atingindo inclusive valores acima do limite médio de controle. Da mesma forma que aconteceu com a concentração dos basófilos, ao cessar o fornecimento do ozônio, as fêmeas (F1000) continuaram apresentando valores médios altos, ainda que dentro da faixa de normalidade para a espécie.

TABELA 10 – Valores mínimos, máximos e médios da concentração de eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	0,14 – 0,36 0,27	0,00 – 0,60 0,29	0,00 – 0,18 0,14	0,16 – 0,38 0,29
1	0,12 – 0,32 0,20	0,07 – 0,23 0,14	0,07 – 0,18 0,13	0,25 – 0,35 0,29
2	0,18 – 0,24 0,21	0,05 – 0,47 0,21	0,13 – 0,27 0,20	0,11 – 0,15 0,13
3	0,13 – 0,28 0,21	0,19 – 0,23 0,21	0,12 – 0,24 0,19	0,16 – 0,41 0,27
4	0,20 – 0,32 0,25	0,14 – 0,32 0,20	0,10 – 0,30 0,19	0,26 – 0,36 0,31
5	0,27 – 0,40 0,35	0,17 – 0,46 0,29	0,20 – 0,40 0,28	0,41 – 0,67 0,58
6	0,15 – 0,26 0,20	0,12 – 0,74 0,39	0,19 – 0,29 0,23	0,18 – 0,62 0,36
7	0,20 – 0,31 0,25	0,08 – 0,51 0,36	0,23 – 0,65 0,37	0,20 – 0,28 0,24
8	0,16 – 0,29 0,24	0,03 – 0,54 0,36	0,21 – 0,34 0,29	0,21 – 0,49 0,31
9	0,19 – 0,28 0,25	0,16 – 0,45 0,26	0,21 – 0,43 0,34	0,32 – 0,39 0,35
10	0,14 – 0,48 0,31	0,00 – 0,53 0,21	0,07 – 0,11 0,09	0,08 – 0,67 0,45

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Da mesma forma que mencionado para os basófilos, como o ozônio atua sobre a medula óssea (Remigio et al., 1999), e esta é responsável pela produção dos eosinófilos (Jain, 1993), é possível que o aumento na concentração dessas células durante o período experimental seja decorrente da ozonioterapia.

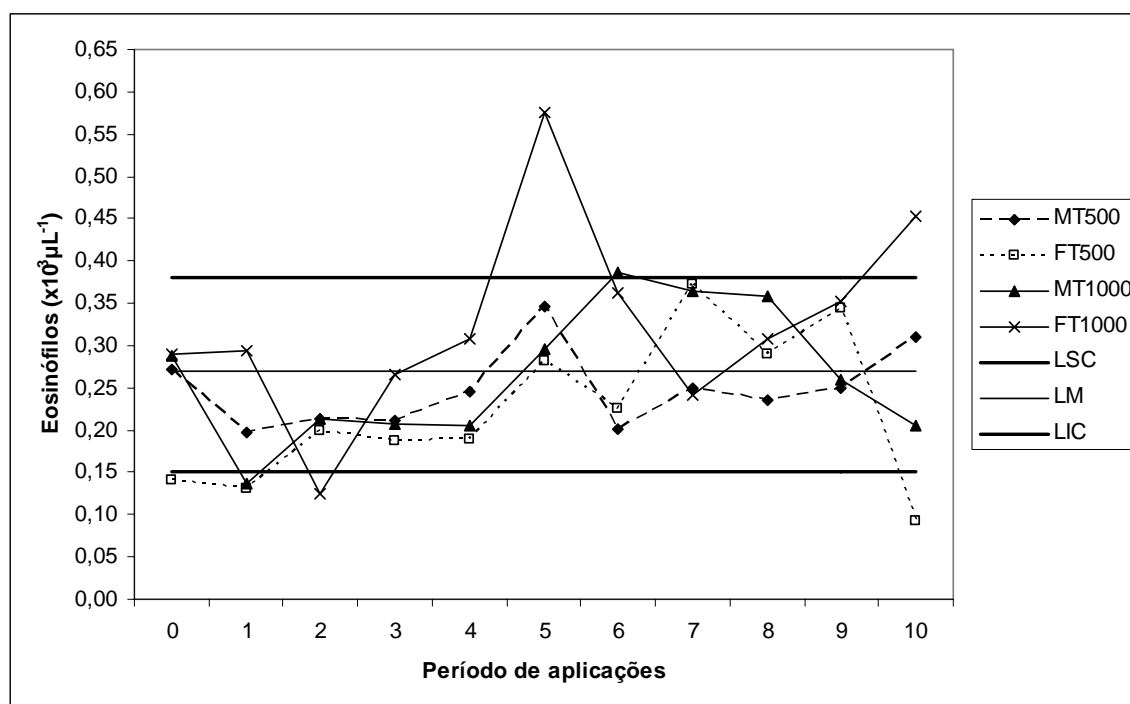


FIGURA 12 – Estimativas de eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Os valores médios da concentração de plaquetas (plaquetas/campo), obtidos nos animais durante as aplicações de ozônio (Tabela 11), encontraram-se dentro dos considerados de referência (5-17,5 plaquetas/campo) para a espécie eqüina (Schalm *et al.*, 1975; Jain, 1993; Menesis *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Taylor & Hillyer, 1997).

Após as primeiras aplicações do ozônio observou-se um acréscimo acentuado na contagem das plaquetas (Figura 13) em todos os eqüinos, independente do sexo (fêmeas ou machos) ou da dose da mistura do gás (500 ou 1000 mL) administrada,

chegando inclusive a valores acima do limite superior de controle. Após a quinta e sexta aplicação, houve uma marcada redução nos valores que se aproximaram dos iniciais. Posteriormente ocorreu oscilação na contagem das plaquetas, porém os valores se mantiveram acima do limite médio após o término da aplicação do ozônio.

As plaquetas têm um papel importante no que se refere a fluidez do sangue, da mesma forma que o hematócrito, os eritrócitos circulantes e a concentração das proteínas no sangue e plasma (Birchard, 1997; Stoiber *et al.*, 2005). Segundo Zee & De Monte (2001), o ozônio age diminuindo a viscosidade do sangue e do plasma em humanos, por redução das macromoléculas plasmáticas e da capacidade de formação de coágulo, o que pode ser constatado pelo aumento no tempo de trombina (TT), fator von Willebrand (vWF) e do plasminogênio (t-PA), assim como pela diminuição do fibrinogênio.

TABELA 11 – Valores mínimos, máximos e médios de plaquetas (por campo) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	6,00 – 9,00 7,67	7,00 – 9,00 8,00	8,00 – 10,00 9,00	7,00 – 7,00 7,00
1	6,75 – 10,00 8,42	8,25 – 9,50 8,75	8,00 – 9,33 8,78	6,50 – 8,25 7,58
2	11,25 – 13,00 12,33	9,25 – 13,00 10,92	10,50 – 11,25 10,83	10,00 – 13,00 11,00
3	10,25 – 14,00 12,00	10,00 – 11,50 11,33	11,00 – 13,50 12,42	9,75 – 12,25 11,25
4	11,00 – 13,00 11,92	8,75 – 13,50 11,75	9,25 – 13,25 11,58	9,25 – 12,50 11,00
5	6,75 – 10,25 8,75	7,00 – 10,00 8,5	9,00 – 12,50 11,17	8,25 – 15,75 10,75
6	8,00 – 8,75 8,25	6,25 – 8,50 7,42	7,25 – 8,75 8,42	9,00 – 9,50 9,17
7	7,75 – 9,25 8,25	7,00 – 10,00 8,75	8,00 – 12,00 9,83	7,25 – 9,00 8,33
8	7,75 – 12,00 9,25	8,75 – 9,50 9,25	7,75 – 10,50 9,33	9,00 – 10,75 9,75
9	6,25 – 11,75 8,42	8,00 – 12,25 9,97	7,50 – 10,00 9,17	7,25 – 9,00 8,25
10	6,00 – 12,00 10,00	9,00 – 13,00 11,33	8,00 – 15,00 11,00	7,00 – 14,00 10,67

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

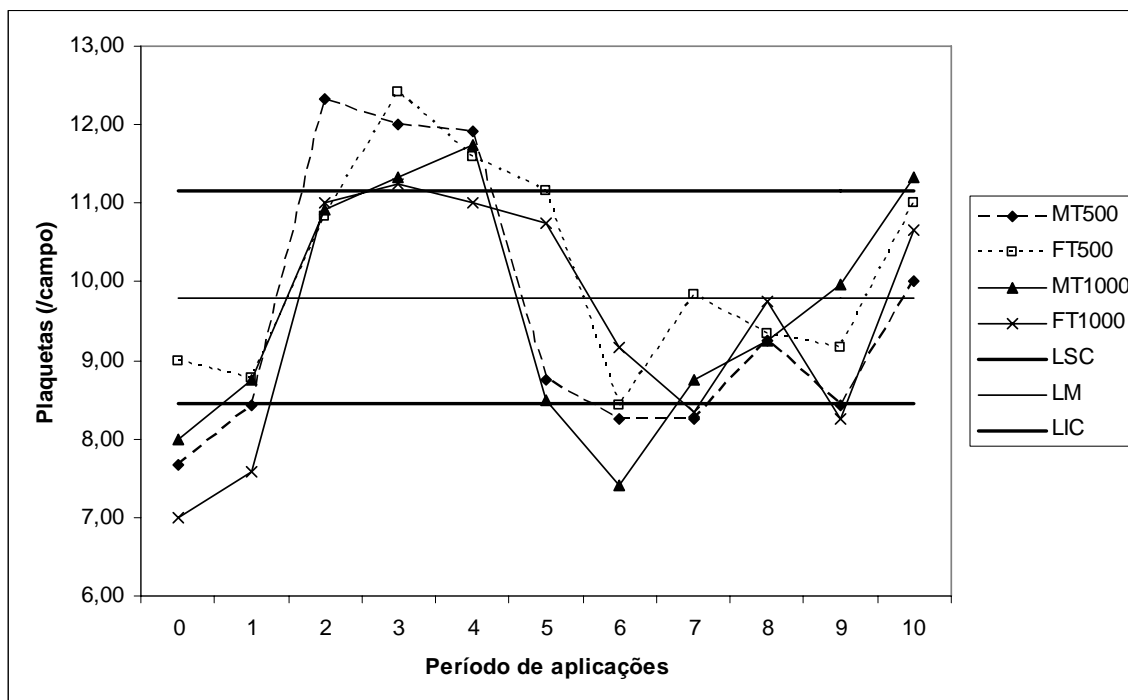


FIGURA 13 – Estimativas de plaquetas (por campo) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL) durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Também por ação direta do ozônio sobre a membrana dos eritrócitos ocorre aumento na fluidez da mesma e diminuição na capacidade de aglutinação dessas células, resultando em diminuição da viscosidade do sangue (Bulies, 1996).

O aumento na quantidade de plaquetas por campo, presente nos animais deste estudo pode ser decorrente da liberação do fator de ativação plaquetária (PAF) que, segundo Wright *et al.* (1994), é devido à ação seletiva do ozônio sobre as membranas celulares, clivando principalmente o ácido araquidônico e produzindo este mediador lipídico, através da ação das fosfolipases (PLA₂, PLC, PLD).

Não houve diferença no comportamento com relação ao sexo ou dose utilizada, sendo estes resultados diferentes dos obtidos por Wright *et al.* (1994), ao estudar plaquetas *in vitro* de porquinhos da índia (*Cavia porcellus*), expostas ao ozônio.

Ainda com relação a ação do ozônio sobre as membranas das plaquetas, Wright *et al.* (1994), mencionaram que ocorre um aumento na permeabilidade

celular, que atua como um sinal para a ativação de processos fibrinogênicos. Esta resposta pode ser direta à mistura do gás ou mesmo aos subprodutos da reação do ozônio.

É possível que a resposta fisiológica à exposição ao ozônio seja inicialmente de fluidificação do sangue, tal como descrito pela literatura científica (Verrazo *et al.*, 1994) para a espécie humana. Entretanto em eqüinos, baseado nos resultados obtidos no presente estudo, é possível que algum fator seja responsável pelo aumento na concentração das plaquetas, o que possivelmente contrapõe os resultados obtidos em outras espécies.

Os valores médios da concentração de glicose (mg dL^{-1}) obtidos nos animais durante as aplicações do ozônio (Tabela 12), encontraram-se dentro dos considerados como referenciais ($75\text{-}115 \text{ mg dL}^{-1}$) para a espécie eqüina (Meyer *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997).

A Figura 14 mostra claramente a redução na concentração da glicose, quando realizada a primeira aplicação do ozônio (exceto FT500), porém com discreto aumento após este achado nas fêmeas tratadas. Em geral, apesar de algumas oscilações, os valores médios da glicose diminuíram até o final do período de aplicações. Durante a quarta e nona aplicação observaram-se valores de glicose abaixo do limite médio e, em ocasiões, do limite inferior de controle nos machos tratados com a menor dose (MT500) e nas fêmeas que receberam a maior dose (FT1000).

As fêmeas que receberam a menor dose apresentaram os valores mais altos na concentração da glicose do que os demais grupos.

A redução da glicose pelo ozônio pode ser decorrente de glicólise, já mencionada por Bulies (1996) em humanos. Segundo Viebahn (1985), além da via glicolítica normal através da hexoquinase, a transformação metabólica da glicose induzida pelo ozônio acontece através da via do ciclo da pentose. Outro aspecto que pode ser mencionado é o aumento da atividade muscular que, segundo Mutis & Pérez (2005), resulta em glicólise ao induzir o trabalho muscular cardíaco.

TABELA 12 – Valores mínimos, máximos e médios de glicose (mg dL^{-1}) em equinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	83,00 – 132,00 110,67	80,90 – 146,00 121,97	63,90 – 87,50 79,17	75,20 – 111,00 92,07
1	90,65 – 100,50 93,96	88,30 – 106,73 98,23	92,33 – 98,50 94,78	81,73 – 93,13 86,90
2	86,65 – 99,25 93,97	96,25 – 98,00 97,17	98,75 – 110,75 102,75	89,25 – 100,50 93,83
3	82,00 – 90,25 85,75	83,25 – 91,50 86,58	85,25 – 111,75 96,83	86,25 – 103,00 93,83
4	82,78 – 86,78 84,35	85,50 – 91,85 87,94	86,55 – 96,90 90,82	78,10 – 83,30 81,22
5	78,00 – 84,00 81,00	78,00 – 85,00 82,00	83,00 – 90,25 87,17	70,00 – 85,00 78,33
6	77,00 – 82,25 79,08	76,00 – 83,50 79,50	85,50 – 87,50 86,50	78,00 – 84,50 81,17
7	76,00 – 84,00 79,67	80,00 – 109,00 90,67	82,00 – 88,00 85,33	76,00 – 92,00 85,67
8	77,00 – 83,50 79,50	79,00 – 110,25 89,83	80,25 – 88,75 84,17	77,00 – 79,00 77,75
9	75,00 – 85,00 80,33	78,00 – 98,00 85,67	86,00 – 93,00 89,00	76,00 – 83,00 79,00
10	71,00 – 90,00 80,00	79,00 – 91,00 83,00	80,00 – 88,00 84,00	78,00 – 85,00 81,67

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Os valores médios da concentração de fibrinogênio (mg dL^{-1}) obtidos nos animais durante as aplicações de ozônio (Tabela 13), encontraram-se dentro dos considerados de referência ($100\text{-}400 \text{ mg dL}^{-1}$) para a espécie equina (Meyer *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997).

O comportamento da concentração do fibrinogênio foi semelhante nos quatro grupos (Figura 15), revelando um discreto aumento com algumas oscilações ao longo do período de aplicação do ozônio. Nos machos e fêmeas que receberam 500 mL de ozônio, esta tendência foi mais linear. Quando o tratamento foi com 1000 mL da mistura do gás, os valores médios obtidos nos machos foram variáveis, porém os valores finais após a retirada do ozônio ainda eram superiores aos iniciais. As fêmeas que receberam 1000 mL da mistura do gás apresentaram uma redução inicial (segunda aplicação) na concentração do fibrinogênio, para aumentar progressivamente na fase intermediária do período experimental, a medida que eram realizadas as aplicações da

mistura do gás, atingindo valores acima do limite médio de controle (LM) e alcançando, posteriormente, valores mais estáveis.

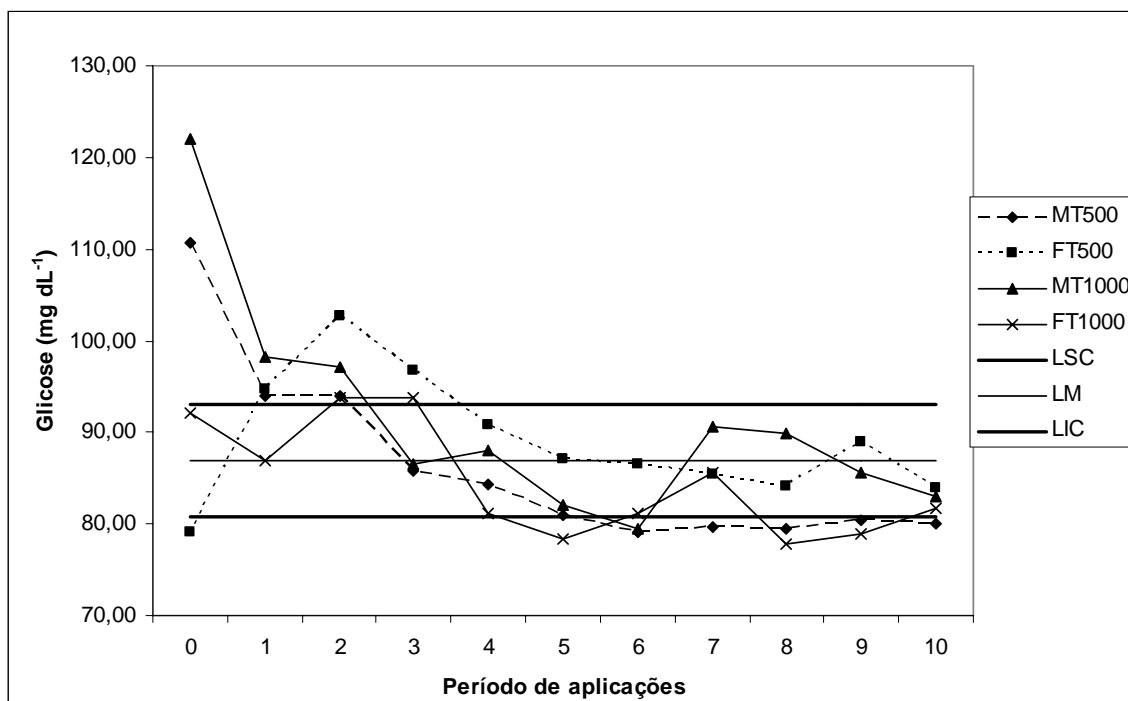


FIGURA 14 – Estimativas de glicose (mg dL^{-1}) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Este aumento na concentração do fibrinogênio com uma tendência a diminuir após a retirada da aplicação da mistura do gás reflete um efeito transitório, conseqüente da administração da mistura do gás, tal como encontrado por Verrazo *et al.* (1995), ao realizar cinco aplicações de ozônio, mediante autohemotransusão em pacientes humanos, com doença arterial oclusiva periférica, onde os efeitos nesta proteína não eram mais observados após 24 horas de administrado o último tratamento. Segundo os autores, esta resposta pode ser decorrente de uma alteração transitória na estrutura molecular do fibrinogênio, em resposta à presença momentânea de radicais livres derivados da ação da ozonioterapia.

TABELA 13 – Valores mínimos, máximos e médios de fibrinogênio (mg dL⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio. (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500	T1000	T500	T1000
	Min-Max (Média)	Min-Max (Média)	Min-Max (Média)	Min-Max (Média)
0	120,00 – 147,60 131,07	115,90 – 123,70 119,83	132,20 – 138,50 135,47	100,70 – 132,40 116,10
1	135,75 – 144,50 139,44	113,85 – 127,30 122,37	134,94 – 138,00 136,28	117,73 – 133,53 125,23
2	120,15 – 140,43 131,59	123,35 – 137,95 130,56	131,90 – 139,38 136,17	112,70 – 117,65 114,75
3	125,45 – 136,68 129,57	118,50 – 209,53 159,53	139,45 – 144,58 141,98	127,35 – 153,55 139,62
4	117,70 – 146,28 133,43	121,00 – 155,70 134,91	129,45 – 135,05 131,54	129,18 – 159,25 141,24
5	121,35 – 159,48 138,62	120,15 – 167,60 141,34	138,00 – 160,43 148,58	123,73 – 161,25 144,25
6	123,13 – 153,88 137,98	106,68 – 143,40 126,38	143,35 – 155,85 149,83	123,80 – 220,28 159,46
7	141,53 – 161,43 149,88	132,43 – 161,95 145,47	145,18 – 163,63 155,75	142,7 – 160,28 148,87
8	107,28 – 150,78 127,97	123,45 – 166,08 147,60	137,4 – 159,53 145,05	128,98 – 160,70 143,70
9	128,15 – 147,38 137,88	122,88 – 193,95 150,54	134,68 – 156,23 143,44	131,25 – 166,43 145,74
10	110,70 – 152,20 133,80	155,20 – 227,10 186,93	99,60 – 131,40 118,87	121,60 – 164,30 143,47

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Na opinião de Senior *et al.* (1986), este aumento do fibrinogênio é bastante importante nos processos de cicatrização. Neste sentido, o tratamento tópico com ozônio vem sendo utilizado para a redução do tempo de retração de feridas em diferentes espécies (Sánchez *et al.*, 1998; Carreira & Almagro, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001; Camps *et al.*, 2003).

Os valores médios da CK (U L⁻¹), obtidos nos animais durante as aplicações de ozônio (Tabela 14), encontraram-se dentro dos considerados como referenciais (60-330 U L⁻¹) para a espécie eqüina (Meyer *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997; Radostits *et al.*, 2002).

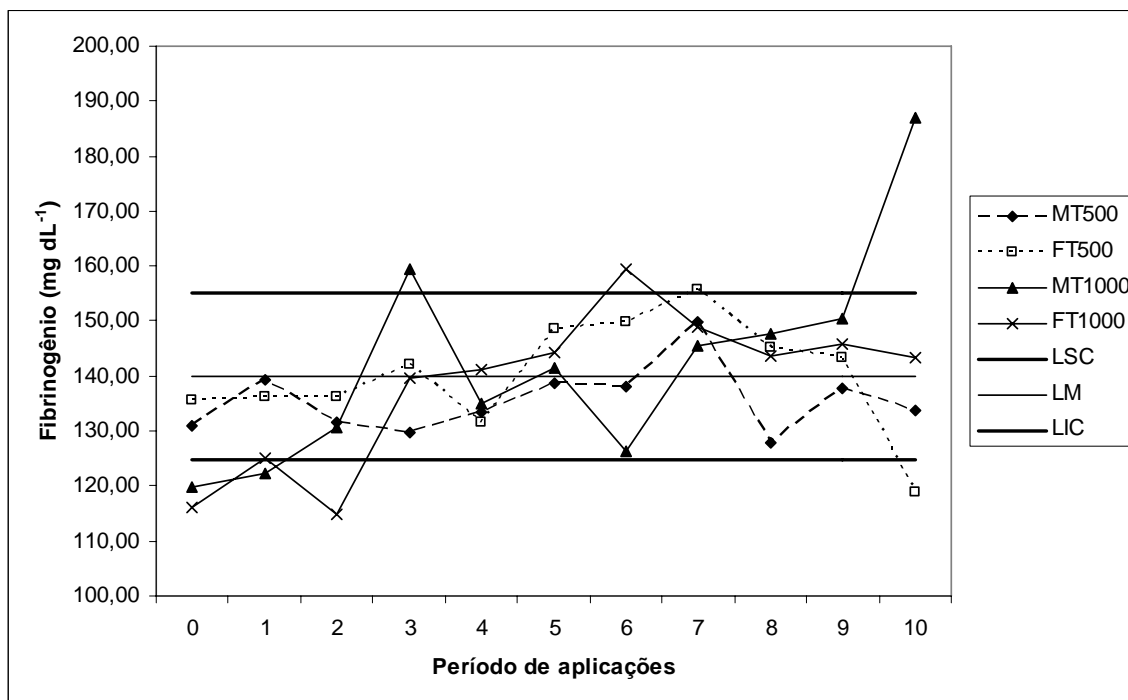


FIGURA 15 – Estimativas de fibrinogênio (mg dL⁻¹) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Ao se monitorar este parâmetro observa-se uma tendência variável, mas ao mesmo tempo similar entre os grupos. Apesar da variação, os valores médios oscilaram próximos aos do valor médio de controle, demonstrando inclusive esta variabilidade após a retirada da aplicação do ozônio, momento no qual, os animais que receberam a menor dose (500 mL) mostraram uma tendência a elevação dos valores médios, enquanto nos que receberam a maior dose (1000 mL) ocorreu uma diminuição (Figura 16).

Esta é uma enzima muito sensível que pode se elevar em concentração sérica tanto por lesão muscular como pela reação na membrana celular ou pelo aumento na permeabilidade da mesma (Martínez, *et al.*, 2000; Hinchcliff *et al.*, 2004). Também pela exposição a radicais livres resultantes da exposição ao ozônio (Zee & De Monte, 2001; Tylicki *et al.*, 2003).

TABELA 14 – Valores mínimos, máximos e médios de creatina quinase (U L⁻¹) em eqüinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500	T1000	T500	T1000
	Min-Max (Média)	Min-Max (Média)	Min-Max (Média)	Min-Max (Média)
0	155,00 – 239,00 195,67	174,00 – 321,00 233,00	255,00 – 618,00 456,67	169,00 – 287,00 223,67
1	174,50 – 245,75 201,83	166,68 – 279,50 234,39	202,33 – 312,67 254,17	168,00 – 281,75 212,25
2	192,88 – 353,65 275,36	137,63 – 301,45 211,31	206,33 – 426,15 279,95	209,55 – 394,40 298,84
3	170,98 – 241,63 198,30	109,35 – 327,48 213,46	118,80 – 174,75 141,83	148,80 – 189,35 174,73
4	116,00 – 219,75 179,50	144,25 – 228,00 179,00	170,00 – 180,25 175,58	189,50 – 218,25 199,42
5	160,20 – 245,83 197,17	130,58 – 270,43 191,21	179,35 – 344,30 238,79	182,73 – 205,33 191,33
6	139,20 – 334,95 225,95	151,85 – 234,93 190,03	158,70 – 314,45 236,53	229,13 – 193,50 210,71
7	130,28 – 241,25 173,19	122,98 – 216,70 173,13	146,63 – 247,30 186,43	151,73 – 301,43 212,18
8	146,00 – 253,00 210,67	188,00 – 346,75 250,33	192,00 – 256,50 218,83	176,25 – 245,50 213,92
9	184,50 – 277,50 225,25	194,25 – 417,00 272,17	181,25 – 216,50 199,17	162,50 – 239,75 199,00
10	221,00 – 593,00 361,67	109,00 – 191,00 153,00	197,00 – 290,00 243,00	124,00 – 185,00 158,33

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

Os valores na concentração da CK podem retornar ao normal em 24 a 48 horas depois de realizado o exercício pelo animal e quando este não é efetuado de forma contínua (Mutis & Pérez, 2005), conseqüentemente as oscilações evidenciadas neste trabalho durante o período de aplicações podem ser explicadas pelo protocolo instituído, com administração da mistura do gás a cada três dias. De forma contrária, os efeitos de membrana poderiam ser evidenciados de forma mais estável ou crescente, dependendo das condições de trabalho e da resposta aos radicais livres decorrentes do estresse oxidativo pelo exercício (Martínez, *et al.*, 2000).

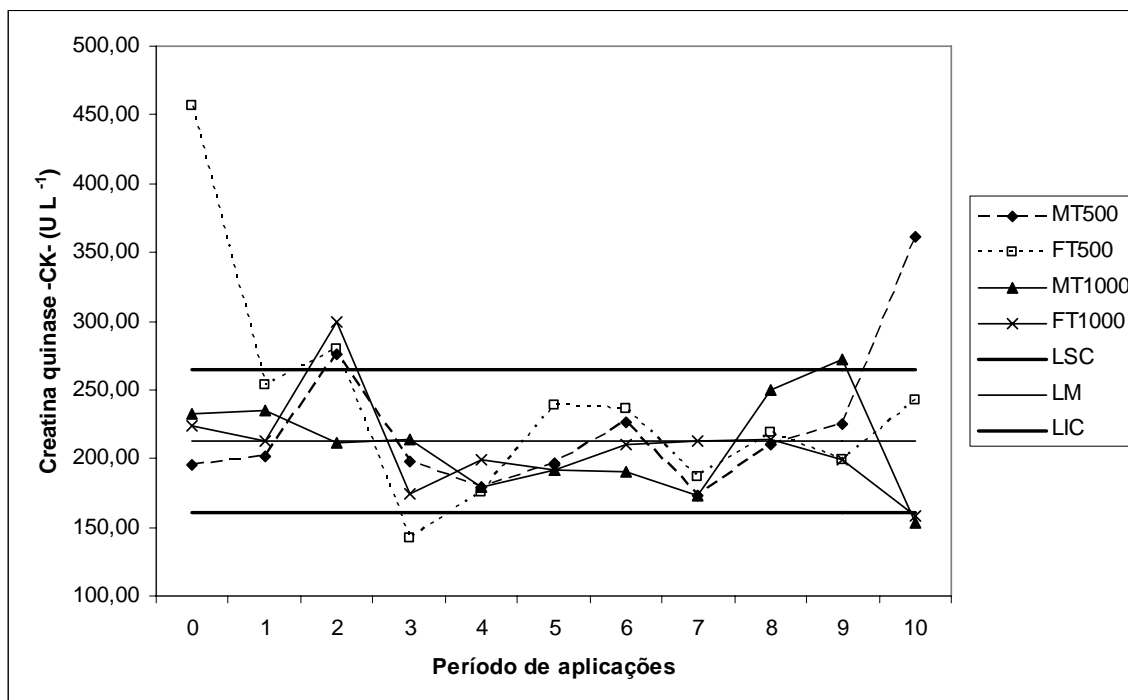


FIGURA 16 – Estimativas de creatina quinase ($U L^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL), durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Segundo Bocci (1994b), o trabalho cardíaco pode ser estimulado no início da ozonioterapia, pelo aumento no volume circulatório decorrente do aumento na fluidez do sangue e/ou pela vasodilatação, com a liberação do óxido nítrico das células endoteliais ou mesmo pelo ajuste do diâmetro vascular, pelo que a resposta fisiológica do animal se reflete no aumento do trabalho muscular cardíaco e, com isto, no aumento na concentração da CK (Birchard, 1997). Entretanto, apesar de haver ocorrido aumento na concentração desta enzima acima do limite superior de controle após algumas aplicações, o protocolo de aplicação do ozônio, a cada três dias pode não ter sido suficiente para manter elevados os valores da creatina quinase.

Os valores médios da gama glutamiltransferase ($U L^{-1}$), obtidos durante as aplicações do ozônio nos animais (Tabela 15), encontraram-se dentro dos considerados de referência (4-44 $U L^{-1}$) para a espécie equina (Meyer *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997; Radostits *et al.*, 2002), ressaltando que o grupo das fêmeas

tratadas com a maior dose, apresentou os valores mais altos desde o início até o final do período de aplicação do ozônio.

TABELA 15 – Valores mínimos, máximos e médios da gama glutamiltransferase (U L⁻¹) em equinos machos e fêmeas, tratados com 500 e 1000 mL de ozônio (Aplicações 1-9).

Aplicações	Machos		Fêmeas	
	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)	T500 Min-Max (Média)	T1000 Min-Max (Média)
0	4,99 – 24,90 12,35	6,51 – 18,00 12,37	4,99 – 5,92 5,30	9,78 – 48,1 23,39
1	4,99 – 24,78 11,92	5,65 – 17,73 11,64	4,99 – 6,10 5,37	7,72 – 46,13 21,81
2	8,48 – 32,45 16,80	9,75 – 27,00 18,78	7,43 – 10,35 9,06	10,68 – 56,1 27,94
3	7,65 – 31,70 16,07	9,15 – 21,93 16,82	6,68 – 10,53 8,64	12,63 – 50,05 26,22
4	4,99 – 15,18 8,48	5,27 – 20,63 12,69	5,15 – 6,19 5,53	4,99 – 33,4 16,00
5	5,19 – 20,70 10,63	5,02 – 18,35 11,98	5,34 – 5,94 5,69	6,39 – 37,6 18,13
6	5,48 – 22,18 11,26	6,03 – 22,98 13,92	5,35 – 5,65 5,54	7,28 – 31,23 16,26
7	4,99 – 18,33 9,77	6,06 – 15,02 11,02	5,89 – 6,09 5,98	6,12 – 31,78 15,42
8	6,15 – 19,03 10,51	5,79 – 19,50 12,81	4,99 – 8,10 6,30	7,20 – 31,28 16,09
9	5,34 – 17,37 9,45	4,99 – 16,02 10,85	5,60 – 15,10 8,85	6,34 – 25,53 13,09
10	5,00 – 16,20 10,93	5,00 – 12,30 9,60	5,00 – 5,24 5,08	5,00 – 22,20 11,13

T500: 500 mL da mistura do gás administrados, T1000: 1000 mL da mistura do gás administrados.

A tendência observada nos quatro grupos foi bastante semelhante com valores máximos após as primeiras aplicações, seguido por uma acentuada diminuição após a quarta aplicação da mistura do gás, para em seguida se manter mais estável até o final do período experimental (Figura 17). Após o término das aplicações, houve uma tendência a redução na concentração da GGT, exceto nos machos tratados com a menor dose (500 mL).

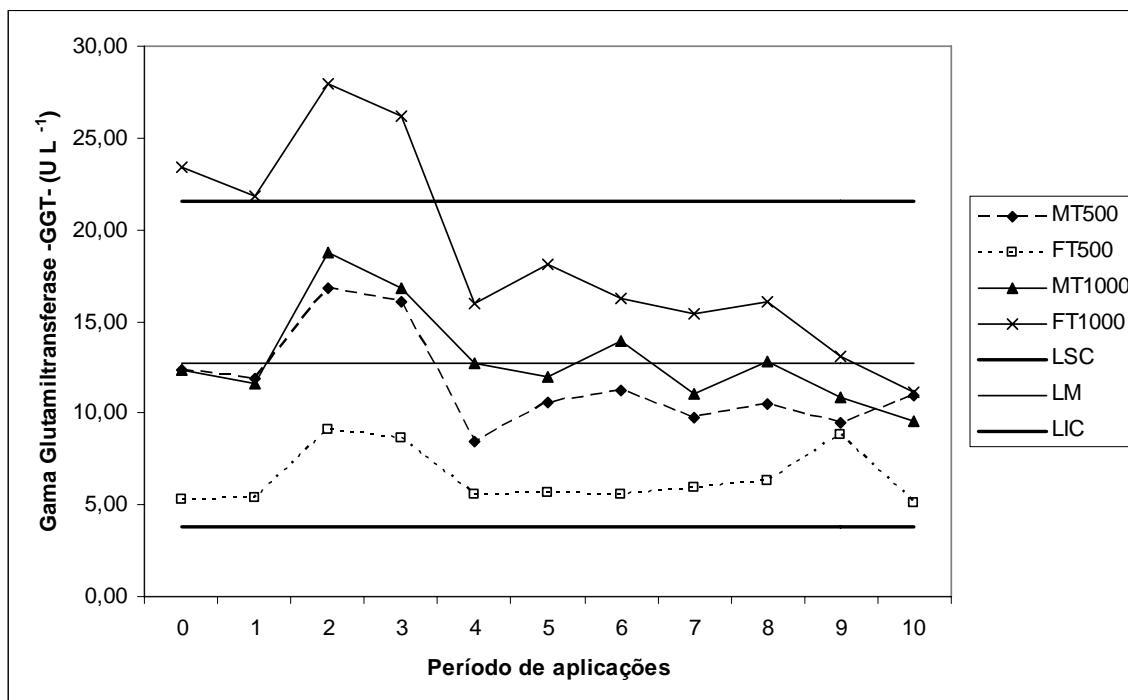


FIGURA 17 – Estimativas de gama glutamiltransferase ($U L^{-1}$) em MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL) durante o período de aplicação de ozônio. LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle (Aplicações 1-9).

Os equinos que receberam a menor dose do ozônio apresentaram, na maior parte do experimento, valores médios de concentração de GGT inferiores e abaixo do limite médio de controle. Os machos tratados com 1000 mL da mistura do gás mantiveram valores médios bastante próximos a esse limite médio, já as fêmeas que receberam esta mesma dose apresentaram valores médios discretamente acima deste.

A avaliação deste parâmetro também é importante no diagnóstico e acompanhamento do trabalho muscular. O aumento dos níveis de GGT sérico pode estar associado à sobrecarga no treinamento em alguns equinos. Animais com baixo rendimento podem apresentar até quatro vezes mais aumento na concentração de GGT, sem que haja evidência laboratorial de problema hepático. A fonte desta atividade elevada ainda é incerta, porém nota-se retorno aos níveis de referência com 30 a 60 dias, caso não haja outro estímulo para sua produção (Hinchcliff *et al.*, 2004).

O aumento na concentração da GGT após a segunda aplicação pode estar relacionado com o aumento no débito cardíaco ocasionado pelo ozônio, mencionado

por Bocci (1994a) como decorrente do aumento da pressão arterial, devido a liberação do óxido nítrico pelas células endoteliais. Segundo Birchard (1997), elevação da pressão pode resultar em aumento no fluxo sanguíneo para o coração e, com isto, maior trabalho é exercido pelas fibras musculares cardíacas. Por outro lado, a estabilização dos valores médios nos animais deste estudo após o aumento inicial pode ser decorrente do adequado condicionamento cardio-muscular dos equinos.

Esta adaptação ao estresse oxidativo causado pelo ozônio é descrito por Bocci (2004) e Sunnen (1989), sendo fundamental que as aplicações sejam administradas de forma contínua e lenta e nas concentrações adequadas (10-80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Plopper *et al.*, 1994).

CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo experimental e com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Existe tendência positiva sobre os valores do hematócrito em eqüinos expostos à ozonioterapia, caracterizada pelo aumento deste parâmetro após três a cinco aplicações.
2. A ozonioterapia tem efeito positivo sobre os eritrócitos de eqüinos, caracterizado pelo aumento na concentração deste parâmetro, particularmente nas fêmeas, após pelo menos três aplicações.
3. Resposta tardia, porém positiva, caracterizada pelo aumento na concentração dos segmentados, é observada durante ozonioterapia em eqüinos.
4. Resposta transitória, porém positiva, caracterizada pelo aumento na concentração dos bastonetes é observada durante ozonioterapia em eqüinos.
5. Independente do sexo e da dose administrada, eqüinos expostos à autohemotransusão com ozônio respondem inicialmente com aumento na contagem de plaquetas.
6. Existe tendência positiva sobre os valores de glicose em eqüinos expostos à ozonioterapia, caracterizada pela diminuição gradativa, porém transitória, deste parâmetro a partir da terceira aplicação.
7. A ozonioterapia apresenta efeito positivo sobre a gama glutamiltransferase de eqüinos, caracterizado pelo aumento, com posterior diminuição na concentração deste parâmetro, a partir da terceira aplicação.
8. A exposição de eqüinos sadios a 500 e 1000 mL da mistura terapêutica de ozônio, mediante autohemotransusão não acarreta alterações clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, p.433-437, 2004.
- BIRCHARD, G.F. Optimal hematocrit: theory, regulation and implications. **Amer. Zool.**, v.37, n.1, p.6 5-72, 1997.
- BOCCI, V. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. **J. Int. Med. Res.**, v.22, n.3, p.131-144, 1994a.
- BOCCI, V. A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the early phase with ozonotherapy (autohaemotherapy). How inflammatory cytokines may have a therapeutic role. **Mediators Inflamm.**, v.3, n.5, p.315-321, 1994b.
- BOCCI, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators Inflamm.**, v.13, n.1, p.3-11, 2004.
- BULIES, C.E. Una solución para exposiciones óseas postraumáticas: asociación de injerto de epiplon mayor con ozonoterapia. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.15, n.2, p.102-111, 1996.
- CAMPS, A.M.R.; ELIAS-CALLES, B.; DENIS, R.; LABRADA, A.; SANTANA, K.; SUÁREZ, K. Utilización del oleozon como alternativa de tratamiento en medicina veterinaria y su impacto en la salud animal. In: FORUM DE CIENCIA Y TECNICA, 15, 2003, La Habana. **Memorias...** La Habana: Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad de Granma, 2003. 6p.
- CARREIRA, V.P.; ALMAGRO, Z.E.U. Efectividad del oleozón en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. **Rev. Cubana Estomatol.**, v.37, n.3, p.140-145, 2000.
- CLAVO, B.; PÉREZ, J.L.; LÓPEZ, L.; SUÁREZ, G.; LLORET, M.; RODRÍGUEZ, V.; MACÍAS, V.; SANTANA, M.; MORERA, J.; FIUZA, D.; ROBAINA, F.; GÜNDEROTH, M. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. **J. Altern. Complement. Med.**, v.9, n.2, p.251-256, 2003.
- DEATON, C.M.; MARLIN, D.J.; SMITH, N.C.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; SCHROTER, R.C.; KELLY, F. J. Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. **Equine Vet. J.**, v.37, n.3, p.243-249, 2005.
- DÍAZ, A.B.; GARCÍA, M.M.; PIÑA, MENÉNDEZ, C.S. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes con enfermedades vasculares periféricas: informe preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.20, n.1, p.45-47, 2001.

- DUCUSSIN, R.J.; NISHIMURA, M.; SARASHINA, T.; USUKA, Y.; TANABE, S.; OTANI, M. Phagocytosis of bovine blood and milk polymorphonuclear leukocytes after ozone gas administration *in vitro*. **J. Vet. Med. Sci.**, v.65, n.4, p.534-539, 2003.
- FILIPPI, A. Influence of ozonised water on the epithelial wound healing process in the oral cavity. In: OZONE WORLD CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- GILL, J.; WANSKA, E. Seasonal changes in erythrocyte, hemoglobin and leukocyte indexes in barren mares of thoroughbred horses. **Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.**, v.26, n.5, p.347-353, 1978.
- GIUNTA, R.; COPPOLA, A.; LUONGO, C.; SAMMARTINO, A.; GUASTAFIERRO, S.; GRASSIA, A.; GIUNTA, L.; MASCOLO, L.; TIRELLI, A.; COPPOLA, L. Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Ann. Hematol.**, v.80, n.12, p.745-748, 2001.
- GUERRA, X.V.; LIMONTA, Y.N.; CONTRERAS, I.H.; FREYRE, R.L.; RAMÍREZ, A.M.P. Resultados de los costos en ozonoterapia. **Rev. Cubana Enfermer.**, v.15, n.2, p.104-108, 1999.
- HERNÁNDEZ, O.D.; GONZÁLEZ, R.C. Ozonoterapia en úlceras flebostáticas. **Rev. Cubana Cir.**, v.40, n.2, p.123-129, 2001.
- HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; GEOR, R.J. **Equine sports medicine and surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Philadelphia: Saunders, 2004. 1364p.
- HOUSEHOLDER, D.D.; DOUGLAS, R.H. Total blood volume and Thoroughbred racing performance. **Equine Vet. Sci.**, v. 25, n. 1, p.14-15 2005.
- JAIN N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5th ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.
- LUMSDEN, J.H.; ROWE, R.; MULLEN, K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. **Can. J. Comp. Med.**, v.44, p.32-42, 1980.
- MANCINI, D.M.; KATZ, S.D.; LANG, C.C.; LAMANCA, J.; HUDAIHED, A.; ANDRONE, A-S. Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure. **Circulation.**, v.107, n.2, p. 294-299, 2003
- MARGALIT, M., ATTIAS, E., ATTIAS, D., ELSTEIN, D., ZIMRAN, A., MATZNER, Y. Effect of ozone on neutrophil function *in vitro*. **Clin. Lab. Haem.**, v.23, n.4, p. 243-247, 2001.

- MARTÍNEZ, R.; SCAGLIONE, M.C.; LUNEBURG, C.; HERNÁNDEZ, E.; ARANEDA, O.; GONZÁLEZ, M.; ESTRADA, M.; WHITE, A. Cambios sanguíneos y sudorales en equinos sometidos a carreras de resistencia. **Av. Cien. Vet.**, v.15, n.1-2, p. 19-30, 2000.
- MATSUMOTO, A.; SAKURAI, S.; SHINRIKI, N.; SUZUKI, S.; MIURA, T. Therapeutic effects of ozonized olive oil in the treatment of intractable fistula and wound after surgical operation. In: WORLD OZONE CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de laboratório veterinária. Interpretação e diagnóstico.** São Paulo: Roca, 1995. 308p.
- MENESIS, A.I.; VILLALOBOS, J.; SANCHO, E. **Manual de hematología química clínica en medicina veterinaria.** Heredia: Fundación UMA, 1993. 87p.
- MORAN, G.; ARAYA, O. Hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio en el caballo: una revisión. **Arch. Med. Vet.**, v.35, n.2, p.127-138, 2003.
- MUTIS, C.A.B.; PÉREZ, T.E.J. Determinación de valores de nitrógeno ureico en sangre (BUN), glucosa, creatin quinase e ácido láctico, pre y post ejercicio en una población de atletas equinos de salto en Bogotá. **Rev. Electron. Vet.**, v.6, n.2, p.9, 2005.
- NOA, M.; HERNÁNDEZ, F.; HERRERA, S.; MENÉNDEZ, S.; CAPOTE, A.; AGUILAR, C. Morphological observations in rats treated with ozone by intramuscular applications. In: OZONE WORLD CONGRESS, 10, 1991, Monaco. **Proceedings...** Monaco: International Ozone Association, 1991. 940p.
- OGATA, A.; NAGAHATA, H. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, n.7, p. 681-686, 2000.
- OHTSUKA, H.; OGATA, A.; TERASAKI, N.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Changes in leukocyte population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. **J. Vet. Med. Sci.**, v.68, n.2, p.175-178, 2006.
- PÉREZ, R.; GARCÍA, M.; CABEZAS, I.; GUZMÁN, R.; MERINO, V.; VALENZUELA, S.; GONZÁLEZ, C. Actividad física y cambios cardiovasculares y bioquímicos del caballo chileno a la competencia de rodeo. **Arch. Med. Vet.**, v.29, n.2, p.221-234, 1997.
- PÉREZ, N.I.M.; FERNÁNDEZ, J.L.C.; CEPERO, S.M. Ozonoterapia en el síndrome de malabsorción intestinal secundario a parasitismo por *Giardia lamblia*: Estudio preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.22, n.3, p.145-149, 2003.
- PLOPPER, C.G.; DUAN, X.; BUCKPITT, A.R.; PINKERTON, K.E. Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lungs of rats exposed for 90 days or 20 months. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.127, n.1, p. 124-131, 1994.

- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica veterinária. Um tratado de doenças nos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Gunabara Koogan, 2002. 1737p.
- REMIGIO A.; GONZÁLEZ, Y.; ZAMORA, Z.; FONSECA, G. ¿Influye la ozonoterapia en la medula ósea? **Ver. Cubana Invest. Biomed.**, v.18, n.1, p.24-26, 1999.
- RIBEIRO, C.R.; NUNES, E.A.M.; SILVA, J.A.R.; GERMINARO, A. Avaliação de constituintes séricos em eqüinos e muares submetidos à prova de resistência de 76km, no Pantanal do Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1081-1086, 2004.
- SÁNCHEZ, A.A.; DÍAZ, R.P.; RODRÍGUEZ, G.G.; LEYVA, S.E.; DÍAZ, S.E.; BORREGO, P.L. Acción del aceite ozonizado sobre la cicatrización de heridas de piel en animales de experimentación. **Rev. CENIC Cienc. Biol.**, v.29, n.3, p.181-184, 1998.
- SANTOS, V.P. **Variações hemato-bioquímicas em eqüinos de salto submetidos a diferentes protocolos de exercícios físicos**. Porto Alegre, RS: UFRS, 2006. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio do Grande do Sul. Faculdade de Veterinária, 2006.
- SCHALM, O.W.; JAIN N.C.; CARROLL E.J. **Veterinary hematology**. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975. 807p.
- SCROLLAVEZZA, P.; ABBONDI, M.; POGLIACOMI, B.; GUARESCHI, D.; DALL'AGLIO, R.; POLDI, R.; PEZZOLI, G. Ozone treatment in mastitis, metritis and retention of fetal membranes in the dairy cow. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF OZONE APPLICATIONS, 2, 1997, Havana. **Proceedings...** Havana: Centro de Investigaciones del Ozono, 1997. 76p.
- SCROLLAVEZZA, P.; ANSALONI, F.; POLIDORI, P.; ABLONDI, M.; POGLIACANI, B. Ozonized autohemotherapy, a new method to treat dairy cow acute interdigital phlegmon. Comparison with ceftiofur and oxytetracycline. **Ital. J. Anim. Sci.**, v.1, n.3, p. 211-216, 2002.
- SCROLLAVEZZA, P.; FERRARI, F.; MARTINI, F.M.; ISOLA, M. Ozone treatment and blood lactate variation after thoroughbred racehorses. In: WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION MONDIAL CONGRESS, 5, 1997, Padova. **Proceedings...** Padova: World Equine Veterinary Association, 1997. 466p.
- SENIOR, R.M.; SKOGEN, W.F.; GRIFFIN, G.L.; WILNER, G.D. Effects of fibrinogen derivatives upon the inflammatory response. Studies with human fibrinopeptide B. **J. Clin. Invest.**, v.77, n.3, p.1014-1019, 1986.
- SPEIRS, V. C. **Exame clínico de eqüinos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda, 1999. 366p.

- STEIN, R.B.S. **Avaliação de métodos para determinação da digestibilidade aparente utilizando farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) em eqüinos.** Pirassununga, SP: USP, 2002. 69p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2002.
- STOIBER, B.; ZACH, C.; IZAY, B.; WINDBERGER, U. Whole blood, plasma viscosity, and erythrocyte aggregation as a determining factor of competitiveness in standard bred trotters. **Clin. Hemorheol. Microc.**, v.32, n.1, p.31-41, 2005.
- SUNNEN, G. Ozone in medicine: overview and future directions. In: OZONE WORLD CONGRESS, 9, 1989, New York. **Proceedings...** New York: International Ozone Association, 1989. 1540p.
- TAYLOR, F.G.R.; HILLYER, M.H. **Diagnostic techniques in equine medicine.** London: Saunders, 1997. 348p.
- TERASAKI, N.; OGATA, A.; OHTSUKA, H.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Changes of immunological response after experimentally ozonated autohemoadministration in calves. **J. Vet. Med. Sci.**, v.63, n.12, p.1327-1330, 2001.
- TYLICKI, L.; NIEWEGLOWSKI, T.; BIEDUNKIEWICZ, B.; CHAMIENIA, A.; DEBSKA-SLIZIEN, A.; ALEKSANDROWICZ, E.; LYSIAK-SZYDŁOWSKA, W.; RUTKOWSKI, B. The influence of ozonated autohemotherapy on oxidative stress in hemodialyzed patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs. **Int. J. Artif. Organs.**, v.26, n.4, p.297-303, 2003.
- VALACCHI, G.; BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. **Mediators Inflamm.**, v.8, n.4-5, p.205-209, 1999.
- VERRAZO, G.; COPPOLA, L.; LUONGO, C.; SAMMARTINO, A.; GIUNTA, R.; GRASSIA, A.; RAGONE, R.; TIRELLI, A. Hyperbaric oxygen, oxygen-ozone therapy, and rheologic parameters of blood in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Undersea Hyperb. Med.**, v.22, n.1, p.17-22, 1995.
- VIEBAHN, R. The biochemical processes underlying ozone therapy. **Ozone: Sci. Eng.**, v.7, n.4, p.275-285, 1985.
- VIGLIANI, A.; BONIPERTI, E.; SCUDO, E. Paravertebral O₂-O₃ treatment in mechanical lumbar pain in riding horses. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia.** v.4, n.1, p.64-69, 2005.
- VILLARRUBIA, V.G.; CALVO, C.G.; SADA, G. Las nuevas vacunas y la respuesta inmunológica (y II). El entorno de la presentación antigénica. Adyuvantes como inductores de linfocitos T-inductores de respuestas de mediación celular. **Med. Clin.**, v.107, n.5, p.185-196, 1996.

- WRIGHT, D.T.; ADLER, K.B.; AKLEY, N.J.; DAILEY, L.A.; FRIEDMAN, M. Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.127, n.1, p.27-36, 1994.
- ZEE, VAN DER H.; DE MONTE A. Ozone auto-haemotherapy in lower limb ulcerations In: WORLD OZONE CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- ZIMRAN, A.; WASSER, G.; FORMAN, L.; GELBART, T.; BEUTLER, E. Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. **Acta Haematol.**, v.102, n.3, p.148-151, 1999.

CAPITULO IV
OZONIOTERAPIA EM EQÜINOS: EFEITOS PRINCIPAIS E DA
INTERAÇÃO DO SEXO E DOSE ADMINISTRADA SOBRE PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS E DA BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA

RESUMO

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Efeitos da ozonioterapia sobre parâmetros clínicos, hematológicos e da bioquímica sangüínea em eqüinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza, Co-Orientadores: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, os efeitos do sexo e da dosagem de ozônio, sobre parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (glicose, fibrinogênio, creatina quinase e gama glutamiltransferase), durante o período de aplicação da mistura do gás. Para isso, foram utilizados 12 eqüinos mestiços, sendo 6 machos e 6 fêmeas, com idades compreendidas entre 4 e 20 anos. Os animais foram submetidos à ozonioterapia, mediante administração de 500 ou 1000 mL da mistura do gás, por via intravenosa, a cada três dias, por um período total de 24 dias. Antes, porém, foram divididos em quatro grupos: MT500, MT1000, FT500 e FT1000, sendo machos (M) que receberam 500 mL e 1000 mL e, fêmeas (F) que receberam 500 e 1000 mL, respectivamente. Os resultados demonstraram que o sexo foi um fator de relevância na concentração dos eritrócitos ($p < 0,05$) em resposta à ozonioterapia, sendo que as fêmeas revelaram valores médios mais altos deste parâmetro, independentemente da dose de ozônio administrada.

Palavras-chave: ozônio, cavalos, hematologia.

ABSTRACT

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2006. **Effects of ozone therapy on equine clinical, hematological and blood biochemistry parameters.** Adviser: Maria Verônica de Souza, Co-Advisers: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

The objective for this study was to evaluate, *in vivo*, the sex and ozone dose effects, over hematological (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, neutrophils, bands, lymphocytes, monocytes, basophils, eosinophils and platelets) and blood biochemistry parameters (glucose, fibrinogen, creatine kinase and gamma glutamyltransferase), during the application period. Twelve cross bred horses, 6 males and 6 females, between 4 and 20 years old were exposed to ozone therapy through the application of 500 and 1000 mL of the gas mixture, intravenously, every three days, for 24 days. Four groups were conformed: MT500, MT1000, FT500 and FT1000, which comprised males (M) and females (F) receiving 500 and 1000 mL of ozone, respectively. The results revealed that sex was a relevant factor on the erythrocytes blood count ($p < 0.05$) in response to ozone therapy, where the females showed higher mean values of this parameter, independently of the administered dose.

Keywords: ozone, horses, hematology.

INTRODUÇÃO

Não há muitos trabalhos em medicina veterinária avaliando os efeitos da ozonioterapia, onde se comparem diferentes concentrações da mistura do gás ou diferença dos efeitos determinados pelo sexo. Em geral, os artigos nesta área comparam um protocolo convencional, com a ozonioterapia, demonstrando os benefícios desse tratamento alternativo (Gracer & Bocci, 2005; Méndez *et al.*, 2005). Adicionalmente, a maioria dos trabalhos é realizada sob condições *in vitro* (Ducussin *et al.*, 2003), sendo assim importante o estudo *in vivo* (Camps *et al.*, 2003) tanto em animais sadios como enfermos, já que a resposta pode ser diferente (Ohtsuka *et al.*, 2006). Nesse sentido, com a finalidade de se detectar possíveis diferenças no protocolo terapêutico da autohemotransfusão ozonizada em eqüinos, o objetivo deste estudo foi verificar se existe influência da dose, do sexo ou interação destes fatores sobre parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas) e da bioquímica sangüínea (glicose, fibrinogênio, creatina quinase e gama glutamiltransferase), em animais submetidos à ozonioterapia e, com isto, poder estabelecer se existe alguma diferença no momento de instituir um protocolo para fêmeas e machos, segundo o efeito desejado depois de realizado o tratamento.

REVISÃO DE LITERATURA

Apesar de todos os avanços relacionados com descobertas científicas em estudos realizados com o ozônio médico, são poucos os trabalhos que comparam resultados nos pacientes humanos ou animais em estudo, pelo sexo; porém, alguns já comparam diferentes dosagens utilizadas e demonstram o efeito dose-dependente do ozônio. Desta maneira, Bocci (1994a), descrevendo possíveis mecanismos de ação em humanos quando instituída a autohemotransfusão, menciona o efeito dose-dependente, relacionando-o também com o tempo de exposição ao gás.

Plopper *et al.* (1994), estudaram o sistema antioxidante em pulmões de ratos, fêmeas e machos e, concluíram que existe efeito dose-dependente do gás e do tempo de exposição ao mesmo, na ativação de enzimas antioxidantes. Por outro lado, os autores não fizeram referência aos resultados obtidos com relação ao sexo dos animais.

Wright *et al.* (1994), estudaram *in vitro*, o efeito do ozônio sobre a ativação de fosfolipases em plaquetas de porquinhos da índia (*Cavia porcellus*), utilizando doses entre 0,05 e 1,0 ppm e, concluíram que houve uma maior ativação das plaquetas quando a maior dosagem foi utilizada.

Deaton *et al.* (2005), avaliaram a resposta antiinflamatória e antioxidante em equinos sadios e com obstrução recorrente das vias aéreas, quando estes foram expostos à inalação de ozônio, sendo constatado que uma dosagem menor (0,25 versus 0,80 ppm), provoca uma menor lesão no epitélio pulmonar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhum momento do período experimental, os animais demonstraram incômodo ou alteração do comportamento durante a ozonioterapia ou imediatamente após a mesma, assim como após as atividades diárias.

Durante avaliação clínica diária os eqüinos não apresentaram sinais de alteração, encontrando-se todos com parâmetros clínicos dentro dos considerados como de referência para a espécie eqüina. Os valores médios de temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória foram de 37,01 °C, 34 bpm e de 24 rpm, respectivamente. As mucosas se mantiveram de coloração rosáceas e úmidas e a taxa de preenchimento capilar inferior a dois segundos, tal como descrito por Speirs (1999), para a espécie eqüina. Entretanto, um dos animais apresentou um ferimento acidental, que ocorreu na época da oitava aplicação.

Um discreto aumento da frequência cardíaca e/ou respiratória poderia ser observado, já que o estresse pode elevar estes parâmetros (Fernandes, 1997).

Durante a aplicação do ozônio, foi possível escutar, sem a utilização de estetoscópio, os movimentos intestinais dos animais, particularmente 5 minutos após o início da aplicação da mistura do gás. Além disso, todos os animais defecavam ao redor de meia hora após a aplicação do ozônio, o que pode sugerir estímulo ou ação do ozônio sobre os mecanismos do trato gastrointestinal. Pérez *et al.* (2003) avaliaram pacientes humanos com a síndrome de má absorção intestinal causada por *Giardia lamblia* tratados com ozonioterapia, no entanto os autores não mencionaram achado semelhante ao nosso.

Alves *et al.* (2004), estudaram o processo de isquemia e reperfusão no jejuno de eqüinos, demonstrando o efeito de proteção tecidual do ozônio sobre lesões de reperfusão no trato gastrointestinal ainda que a via de administração tenha sido a intravenosa.

Nas Tabelas de 1 a 15 encontram-se os valores médios obtidos a partir de cada parâmetro hematológico e da bioquímica sanguínea dos eqüinos avaliados, por dosagem de ozônio (500 mL ou 1000 mL) e sexo (machos ou fêmeas), nos diferentes dias de aplicação.

Ao se avaliar as Tabelas 1, 4, 7, 10, 11, 12 e 13 observa-se que não houve efeito ($p > 0,05$) da ozonioterapia sobre os valores do hematócrito, leucócitos totais, linfócitos, basófilos, plaquetas, creatina quinase, e gama glutamiltransferase

respectivamente, que fossem diferenciados pelo tratamento, sexo ou a interação destes. Isto pode ser constatado ao observar a semelhança dos valores médios de cada parâmetro avaliado durante todo o período de aplicações.

Ao se avaliar as Tabelas 2, 5, 6, 8, 9, 14 e 15 observa-se que houve ao menos um efeito ($p < 0,05$) do ozônio em algum dos períodos de aplicação seja pela dosagem, sexo ou interação destes sobre os valores da hemoglobina, segmentados, bastonetes, monócitos, eosinófilos, glicose e fibrinogênio, respectivamente. Entretanto, este não foi um achado de relevância clínica no estudo, por não apresentar o mesmo comportamento nos outros períodos de aplicação.

TABELA 1 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre o hematócrito (%) em cada período de aplicação.

		<i>Hematócrito (%)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	37,78	38,49	35,64	36,94	40,38	39,70	38,16	38,23	38,68
T500	Fêmea	38,27	40,56	39,78	39,61	39,88	41,53	41,03	39,53	42,66
T1000	Macho	37,93	39,94	41,32	42,08	40,24	40,43	40,57	42,03	41,98
T1000	Fêmea	35,86	38,83	42,97	42,48	40,27	43,88	41,06	40,98	45,82
<i>Efeito</i>	<i>Dosagem</i>	-1,13	-0,14	4,43	4,00	0,13	1,54	1,22	2,61	3,23
	<i>Sexo</i>	0,79	-0,47	-2,89	-1,53	0,24	-2,64	-1,68	-0,13	-3,91
	<i>Interação</i>	1,29	1,59	1,24	1,14	-0,27	-0,81	1,19	1,17	0,08
<i>CV(%)</i>		7,63	12,84	9,30	9,03	12,40	10,97	6,82	7,97	12,51

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação.

Apesar das mudanças nos valores médios não apresentarem significância ($p > 0,05$) na maioria dos parâmetros avaliados, cabe ressaltar que o hematócrito (Tabela 1) nas fêmeas, quando receberam a menor dose da mistura do gás em avaliação (500 mL), apresentou-se na maioria dos períodos de aplicação, com valores médios maiores do que nos machos. Quando administrados 1000 mL, os valores não apresentaram uma diferença pelo sexo nem pelo tratamento ($p > 0,05$), porém pode ser observado, ainda que não significativamente uma diferença pelo tratamento utilizado, em que os valores médios atingidos foram, em sua maioria, superiores quando comparados com o grupo T500. Adicionalmente, pode ser observado que para as quatro combinações avaliadas, os valores médios no final do período de aplicações

foram maiores em relação aos valores iniciais, demonstrando o efeito acumulativo da ozonioterapia para este parâmetro hematológico. Também pode ser observado que depois de realizados os dois primeiros períodos de aplicação nas fêmeas com a maior dose (1000 mL), estas apresentaram valores menores, quando as mesmas foram comparadas no período total, o que pode inferir uma discreta hemólise ao utilizar uma maior dosagem nas fêmeas, como já relatado com pacientes humanos (Zimran *et al.*, 1999; Bocci, 2004), sem implicar risco aos pacientes sob tratamento, particularmente se a hemólise é pequena. Adicionalmente, a partir do terceiro período de aplicação estes animais recuperam os valores até o final do experimento. Esta ausência ($p>0,05$) da resposta à ozonioterapia sobre o hematócrito, também foi descrita por Bocci (2004), sendo resultante da não modificação do volume eritrocítico induzido pela terapia.

Para a hemoglobina (Tabela 2) não se observaram efeitos ($p>0,05$) da ozonioterapia determinados pelo sexo ou pela dosagem, exceto quando realizada a sétima aplicação, onde houve efeito negativo ($p<0,05$) do sexo, tendo as fêmeas as maiores médias, independentes da quantidade da mistura do gás nelas administrada. Apesar de não haver efeito ($p>0,05$) do sexo nos demais períodos de aplicação, verificou-se esta mesma tendência nos valores médios do parâmetro ao longo do período experimental quando utilizados os 500 mL de ozônio. Quando foram administrados 1000 mL da mistura do gás, os valores da hemoglobina das fêmeas e machos foram similares. No final do período experimental, com a nona aplicação pode-se observar um discreto aumento nos valores de hemoglobina nos animais de três grupos avaliados (MT500, MT1000, FT1000).

Turrent & Menéndez (2001), mais do que elevação ou diminuição da hemoglobina ressaltam o aumento da saturação desta com oxigênio, após cinco sessões de ozônio através da autohemotransfusão em pacientes humanos em estado crítico. Esta opinião é compartilhada por Giunta *et al.* (2001), que mencionaram haver uma maior liberação de oxigênio para os tecidos. Estes autores não encontraram influência do tratamento, sexo ou interação destes em humanos tratados com ozônio.

TABELA 2 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre a hemoglobina (g dL⁻¹) em cada período de aplicação.

		<i>Hemoglobina (g dL⁻¹)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	9,37	9,21	9,25	9,28	9,19	9,34	9,08	9,13	9,51
T500	Fêmea	10,69	10,92	10,53	10,21	10,73	10,63	10,62	10,22	10,53
T1000	Macho	9,73	10,33	10,23	10,10	9,91	10,48	9,76	10,23	10,48
T1000	Fêmea	10,09	10,13	10,49	10,33	10,19	10,48	10,53	10,69	11,13
<i>Efeito</i>	Dosagem	-0,11	0,17	0,47	0,47	0,09	0,50	0,29	0,79	0,78
	Sexo	-0,84	-	-0,77	-0,56	-0,91	-0,65	-	-0,78	-0,84
	Interação	0,48	0,76	0,51	0,35	0,63	0,65	1,15*	0,31	0,18
<i>CV(%)</i>		12,58	12,67	10,63	11,80	11,94	11,85	8,29	10,46	10,59

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação. * Significativo pelo teste F (p<0,05).

Gill e Wanska (1978) ao avaliarem índices hematológicos em eqüinos da raça PSI, observaram mudanças associadas a alterações estacionais onde, no inverno, os valores de hemoglobina diminuía em ambos os sexos. Nas condições do presente estudo não ocorreram mudanças bruscas na temperatura nem na umidade do ambiente, sendo a temperatura média ao redor de 30°C, o que permitia conforto aos animais.

Nazifi *et al.* (2003), também mencionaram que o sexo, assim como a idade, não interferem na concentração de hemoglobina de eqüinos em condições normais.

Čebulj-Kadunc *et al.* (2002), quando avaliaram os parâmetros hematológicos em cavalos Lipizanos em repouso, encontraram diferença significativa determinada pelo sexo, onde as éguas avaliadas apresentaram valores médios inferiores quando comparadas com os garanhões. Exceção foi observada nos animais com idade entre um e dois anos, onde as fêmeas apresentaram valores superiores.

Schalm *et al.* (1975), descrevem também que as raças Quarto de Milha e PSI costumam apresentar valores menores de hemoglobina nos machos. Os animais incluídos neste estudo possuem porcentagem desta raça na sua genética, o que poderia justificar os discretos valores mais elevados da hemoglobina nas fêmeas. Adicionalmente, os animais são resultado do cruzamento com a raça Andaluza que, segundo Čebulj-Kadunc *et al.* (2002), apresenta valores similares de hemoglobina com a raça Quarto de Milha.

Na avaliação da concentração dos eritrócitos, observa-se o efeito ($p < 0,05$) do sexo a partir da quarta aplicação do ozônio (Tabela 3), independente da quantidade administrada. Esta diferença é observada desde o início do período de aplicações ($p > 0,05$), no entanto o aumento ($p < 0,05$) na concentração dos eritrócitos é, como mencionado acima, apenas observado a partir da quarta aplicação, fato a considerar quando se deseja alcançar um efeito do ozônio sobre este parâmetro. Todos os valores ao final do período experimental foram maiores quando comparados com os valores iniciais dos grupos sob avaliação.

Segundo Bocci (1994a), os eritrócitos compreendem o principal alvo dentro da corrente sangüínea, devido ao contato entre a mistura do gás e as membranas destas células.

TABELA 3 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.

		<i>Eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	7,55	7,90	7,26	7,61	8,37	8,10	7,74	7,80	7,85
T500	Fêmea	9,04	9,24	9,04	9,31	9,55	9,53	9,57	9,26	9,64
T1000	Macho	7,26	7,84	7,92	8,26	8,08	7,91	8,00	8,42	8,00
T1000	Fêmea	7,77	8,36	8,99	9,38	8,81	9,46	8,88	9,01	9,81
<i>Efeito</i>	<i>Dosagem</i>	-0,77	-0,47	0,31	0,36	-0,51	-0,14	-0,22	0,19	0,16
	<i>Sexo</i>	-1,00	-0,93	-1,43	-1,41*	-0,96	1,49*	-1,36*	-1,02	1,80*
	<i>Interação</i>	0,49	0,41	0,36	0,29	0,22	-0,06	0,48	0,44	-0,01
<i>CV(%)</i>		10,49	10,27	13,54	8,53	10,72	12,76	8,94	9,61	14,80

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação. * Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Os valores médios na concentração de eritrócitos diferenciados pelo sexo podem estar relacionados com o componente genético dos animais deste estudo, já que como mencionado anteriormente, são descendentes da raça Quarto de Milha que, de acordo com Schalm *et al.* (1975), os machos apresentaram menores valores na contagem destas células. No entanto, se comparado com os valores do hematócrito, os dos eritrócitos se mostraram maiores nas fêmeas durante todo o período experimental.

Neste estudo ficou demonstrado que para se obter aumento na contagem dos eritrócitos pela ozonioterapia, são necessários pelo menos quatro períodos de aplicação da mistura do gás.

É importante mencionar que quando se utiliza o ozônio numa dosagem adequada, a hemólise resultante é muito baixa, tal como mencionado por Zimran *et al.* (1999) e Margalit *et al.* (2001). Segundo Verrazo *et al.* (1995), esta lise das células vermelhas é seletiva, somente alterando a membrana dos eritrócitos pela ação de produtos de reação do ozônio com os fosfolipídios de membrana.

A contagem dos leucócitos totais (Tabela 4), não respondeu ($p>0,05$) à ozonioterapia, de maneira que mostrasse alguma diferença pelo sexo, tratamento ou a interação destes, sendo que as médias dos quatro grupos estudados foram similares.

Nossos resultados corroboram com os de Turrent & Menéndez (2001) e Méndez *et al.* (2005), em estudos com pacientes humanos, que não especificam efeito do ozônio sobre a contagem de leucócitos totais e sim mais especificamente sobre determinadas células do diferencial da linha branca. Ohtsuka *et al.* (2006), estudando vacas sadias e com processos inflamatórios, não observaram alterações significativas na contagem total de leucócitos após autohemotransusão.

TABELA 4 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os leucócitos totais ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.

		<i>Leucócitos Totais ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	7,54	7,70	7,43	7,59	7,42	6,83	7,67	7,99	7,76
T500	Fêmea	9,37	10,09	9,14	8,65	9,03	8,98	9,04	8,63	9,61
T1000	Macho	7,83	8,63	7,48	8,26	7,68	8,14	9,85	8,83	9,21
T1000	Fêmea	7,80	8,04	8,28	8,09	7,57	8,85	8,17	8,03	8,48
<i>Efeito</i>	<i>Dosagem</i>	-0,64	-0,55	-0,41	0,05	-0,61	0,59	0,66	0,12	0,16
	<i>Sexo</i>	-0,90	-0,90	-1,25	-0,45	-0,75	-1,43	0,16	0,07	-0,56
	<i>Interação</i>	0,93	1,49	0,46	0,61	0,86	0,72	1,53	0,72	1,29
<i>CV(%)</i>		17,80	16,60	15,61	13,52	18,28	19,08	27,17	22,95	27,34

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação.

Segundo Valacchi & Bocci (1999), uma discreta diminuição na contagem de leucócitos totais pode ocorrer sem implicação de lesão a estas células, após administração de ozônio via autohemotransfusão, já que este gás induz a quimiotaxia de células do diferencial, por estímulo de citocinas, com aumento das mesmas na circulação periférica até o local do processo inflamatório. Entretanto, Bocci (1994b) menciona uma leucocitose relativa por neutrofilia em pacientes humanos que receberam autohemotransfusão ozonizada.

Ao se avaliar os valores médios dos segmentados (Tabela 5) observaram-se efeitos ($p < 0,05$) da ozonioterapia determinados pela dosagem depois de realizadas a terceira e sexta aplicações, inclusive com uma interação ($p < 0,05$) destes fatores na terceira aplicação. No entanto, estes efeitos não traduzem um comportamento biológico definido e relevante, pois não houve continuidade.

TABELA 5 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.

		<i>Segmentados ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	4,56	4,15	4,08	4,46	4,13	3,74	4,81	4,92	4,44
T500	Fêmea	3,15	4,15	3,27	3,77	4,38	4,30	4,52	3,97	3,95
T1000	Macho	4,27	4,39	3,86	4,71	4,17	5,11	6,72	5,93	5,41
T1000	Fêmea	4,36	4,46	5,01	4,39	4,11	6,11	5,14	4,91	4,86
<i>Efeito</i>	Dosagem	0,46	0,27	0,77*	0,43	-0,12	1,59*	1,27	0,98	0,93
	Sexo	0,66	-0,04	-0,17	0,51	-0,09	-0,78	0,94	0,98	0,52
	Interação	-	-0,04	-	-0,19	0,16	-0,22	0,65	0,04	0,03
		0,75		0,98*						
<i>CV(%)</i>		23,49	22,88	8,46	15,29	18,21	15,55	30,16	20,05	33,12

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação. * Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Margalit *et al.* (2001), descrevendo os efeitos terapêuticos do ozônio, relataram sobre a importância deste como antiinflamatório, já que o gás aumenta a motilidade e adesão dos polimorfonucleares, a partir da circulação periférica, induzindo assim a uma leucocitose com neutrofilia. Bocci (1994b) e Sánchez *et al.* (1998) também mencionaram sobre o aumento da atividade fagocitária destas células.

Ainda assim, não existem relatos sobre o efeito do ozônio sobre estas células, pelos fatores em avaliação contemplados neste estudo (tratamento, sexo ou interação destes). Existe sim um efeito do gás diretamente o sobre os neutrófilos, seja *in vitro* (Bocci, 1994a) ou *in vivo* (Deaton *et al.*, 2005).

Deaton *et al.* (2005) estudando eqüinos sadios e com obstrução das vias aéreas, constataram que, após exposição ao ozônio por inalação, os animais enfermos apresentaram uma resposta inflamatória maior, determinada pela contagem de neutrófilos em lavagens bronco-alveolares. Segundo os autores, isto reforça a importância do ozônio na indução à migração destas células para o local do processo inflamatório.

Ao se examinar os dados apresentados na Tabela 6, nota-se efeito ($p < 0,05$) da dosagem sobre a concentração dos bastonetes depois de realizada a terceira aplicação. Os animais que receberam 1000 mL de ozônio apresentaram maior estímulo na contagem destas células imaturas, o que sugere que uma dose mais elevada de ozônio poderia induzir uma resposta mais ativa da medula óssea na liberação destas células na circulação sanguínea. A indução da mielopoiese é sugerida por Margalit *et al.* (2001), ao estudar a exposição *in vitro* de neutrófilos ao ozônio.

TABELA 6 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.

		<i>Bastonetes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	0,01	0,02	0,04	0,08	0,03	0,04	0,02	0,04	0,02
T500	Fêmea	0,01	0,07	0,07	0,09	0,07	0,03	0,04	0,02	0,03
T1000	Macho	0,01	0,11	0,08	0,04	0,14	0,16	0,03	0,01	0,00
T1000	Fêmea	0,02	0,06	0,16	0,09	0,02	0,06	0,01	0,01	0,02
<i>Efeito</i>	<i>Dosagem</i>	0,00	0,04	0,07*	-0,02	0,03	0,08	-0,00	-0,02	-0,02
	<i>Sexo</i>	-0,00	-0,00	-0,06	-0,03	0,04	0,06	0,00	0,01	-0,01
	<i>Interação</i>	-0,00	0,06	-0,03	-0,02	0,08*	0,04	0,02	-0,01	-0,01
<i>CV(%)</i>		158,25	75,81	47,11	59,47	89,29	163,48	114,51	107,28	114,90

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação. * Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Também houve um efeito diferenciado ($p < 0,05$) (interação dos fatores) após a quinta aplicação, demonstrando que neste período de aplicação a menor dose do ozônio (500 mL) foi capaz de estimular mais as fêmeas, enquanto uma maior dose foi necessária para estimular a concentração deste parâmetro nos machos. Por outro lado, estes efeitos encontrados no terceiro e quinto períodos não foram observados nos demais. Além disso, a variabilidade encontrada numa mesma combinação de tratamento, sexo e período de aplicação foi alta, o que confere à característica uma certa imprecisão, pelo que se sugere um estudo mais detalhado no que se refere a este parâmetro, para a verificação do real efeito do ozônio determinado pelo sexo, tratamento ou a interação destes, ainda que haja relatos de resposta à ozonioterapia neste tipo de células em humanos, *in vivo* (Bocci, 1994b) e *in vitro* (Margalit, *et al.*, 2001).

De uma forma geral, não foram constatados efeitos ($p > 0,05$) do sexo, dosagem ou pela interação destes sobre a contagem dos linfócitos, tal como apresentado na Tabela 7. Por outro lado, alguns autores (Bocci, 1994a; Sánchez *et al.*, 1998; Terasaki *et al.*, 2001; Ohtsuka *et al.*, 2006) já relataram ativação de linfócitos na produção de citocinas, regulando assim o sistema imune ou a resposta humoral do animal após ozonioterapia; embora não fizessem referência ao sexo, tratamento ou à interação entre estes.

TABELA 7 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.

		<i>Linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	2,61	3,06	2,82	2,59	2,63	2,60	2,31	2,39	2,80
T500	Fêmea	5,82	5,49	5,44	4,38	4,02	4,14	3,78	4,16	5,02
T1000	Macho	3,21	3,56	2,98	2,98	2,67	2,22	2,38	2,23	3,18
T1000	Fêmea	2,90	3,15	2,55	2,96	2,61	2,12	2,60	2,67	3,06
<i>Efeito</i>	Dosagem	-1,16	-0,92	-1,36	-0,52	-0,68	-1,20	-0,56	-0,83	-0,79
	Sexo	-1,46	-1,01	-1,09	-0,89	-0,66	-0,72	-0,85	-1,10	-1,05
	Interação	1,76	1,42	1,53	0,90	0,72	0,82	0,62	0,67	1,17
<i>CV(%)</i>		38,52	43,75	39,47	38,46	36,56	45,31	30,98	41,33	44,55

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação.

Na Tabela 8 está demonstrado o efeito ($p < 0,05$) da dosagem sobre a concentração dos monócitos depois de realizada a sexta aplicação do ozônio, momento no qual com a menor dose (500 mL) foi possível atingir maiores valores para este parâmetro. Porém, assim como ocorreu com outros parâmetros avaliados, este efeito não foi persistente. Ainda assim, observando os valores médios destas células, se percebe que estes se mantiveram praticamente similares em todo o período de aplicações.

TABELA 8 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.

<i>Combinações</i>		<i>Monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)</i>								
		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	0,12	0,15	0,17	0,10	0,16	0,21	0,19	0,27	0,15
T500	Fêmea	0,18	0,13	0,14	0,19	0,24	0,23	0,22	0,13	0,20
T1000	Macho	0,14	0,28	0,25	0,21	0,25	0,18	0,25	0,16	0,18
T1000	Fêmea	0,15	0,17	0,22	0,23	0,15	0,11	0,13	0,10	0,11
<i>Efeito</i>	Dosagem	-0,00	0,09	0,07	0,07	-0,00	-	-0,01	-0,07	-0,03
	Sexo	-0,03	0,07	0,03	-0,06	0,01	0,02	0,04	0,10	0,02
	Interação	0,03	0,05	-0,00	0,03	0,09	0,05	0,07	-0,04	0,06
<i>CV(%)</i>		57,73	86,13	41,87	34,46	51,38	33,39	93,75	82,39	84,87

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação. * Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Na primeira e quinta aplicações de ozônio observaram-se efeitos da ozonioterapia diferenciados ($p < 0,05$) pelos fatores dosagem e sexo sobre a contagem dos eosinófilos (Tabela 9). Este efeito demonstra que as fêmeas foram menos responsivas ao aumento na concentração de eosinófilos durante os períodos acima mencionados, quando foram administrados 500 mL do ozônio. Já os machos foram menos estimulados quando administrados 1000 mL da mistura do gás. No entanto, este efeito não foi relevante e consistente, não ocorrendo efeitos similares durante as demais aplicações do ozônio. Adicionalmente, os valores médios foram similares em todo o período experimental para todos os grupos.

A contagem de basófilos não resultou alterada pela ozonioterapia, de maneira diferenciada pelo sexo, dosagem ou a interação destes (Tabela 10), sendo todos os valores médios similares ($p>0,05$) ao longo do período experimental. Por outro lado, estes resultados similares ($p>0,05$) podem indicar que a ozonioterapia, com as duas dosagens avaliadas neste estudo, *in vivo*, não acarreta clinicamente, hipersensibilidade em eqüinos.

TABELA 9 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.

		<i>Eosinófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	0,20	0,21	0,21	0,25	0,35	0,20	0,25	0,24	0,25
T500	Fêmea	0,13	0,20	0,19	0,19	0,28	0,23	0,37	0,29	0,34
T1000	Macho	0,14	0,21	0,21	0,20	0,29	0,39	0,36	0,36	0,26
T1000	Fêmea	0,29	0,13	0,27	0,31	0,58	0,36	0,24	0,31	0,35
<i>Efeito</i>	Dosagem	0,05	-0,04	0,04	0,04	0,12	0,16	-0,00	0,07	0,01
	Sexo	-0,05	0,05	-0,02	-0,03	-0,11	0,00	-0,00	-0,00	-0,10
	Interação	-	0,04	-0,04	-0,08	-	0,03	0,12	0,06	0,00
		0,11*				0,18*				
<i>CV(%)</i>		41,34	63,29	36,95	35,13	32,60	68,56	57,14	57,03	35,46

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação. * Significativo pelo teste F ($p<0,05$).

TABELA 10 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre os basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) em cada período de aplicação.

		<i>Basófilos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	0,04	0,10	0,11	0,10	0,12	0,05	0,08	0,14	0,09
T500	Fêmea	0,07	0,03	0,04	0,03	0,05	0,05	0,11	0,06	0,07
T1000	Macho	0,06	0,07	0,10	0,13	0,16	0,09	0,11	0,14	0,18
T1000	Fêmea	0,08	0,08	0,08	0,11	0,10	0,09	0,03	0,04	0,09
<i>Efeito</i>	Dosagem	0,02	0,01	0,02	0,05	0,04	0,04	-0,02	-0,02	0,06
	Sexo	-0,03	0,03	0,05	0,05	0,07	-0,00	0,03	0,09	0,05
	Interação	0,01	-0,04	-0,02	-0,02	-0,01	0,00	0,05	0,01	0,04
<i>CV(%)</i>		78,32	80,44	87,32	88,49	79,73	60,28	77,51	81,95	69,53

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação.

Não se observou resposta à ozonioterapia sobre a concentração de plaquetas (Tabela 11), CK (Tabela 12) e GGT (Tabela 13) determinada pelo sexo, dosagem ou interação destes ($p>0,05$). Apesar disso, cabe ressaltar que foi observado aumento na contagem deste parâmetro após a segunda aplicação em todas as combinações estudadas.

TABELA 11 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre as plaquetas (por campo) em cada período de aplicação.

		<i>Plaquetas (por campo)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	8,42	12,33	12,00	11,92	8,75	8,25	8,25	9,25	8,42
T500	Fêmea	8,78	10,83	12,42	11,58	11,17	8,42	9,83	9,33	9,17
T1000	Macho	8,75	10,92	11,33	11,75	8,50	7,42	8,75	9,25	9,97
T1000	Fêmea	7,58	11,00	11,25	11,00	10,75	9,17	8,33	9,75	8,25
<i>Efeito</i>	Dosagem	-0,43	-0,63	-0,92	-0,38	-0,33	-0,04	-0,50	0,21	0,32
	Sexo	0,40	0,71	-0,17	0,54	-2,33	-0,96	-0,58	-0,29	0,49
	Interação	0,76	-0,79	0,25	0,21	0,08	-0,79	1,00	-0,21	1,24
<i>CV(%)</i>		12,60	12,30	12,44	16,67	26,94	9,75	16,25	15,70	22,39

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação.

TABELA 12 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre a creatina quinase ($U L^{-1}$) em cada período de aplicação.

		<i>Creatina quinase ($U L^{-1}$)</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Tratamento</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	201,83	275,36	198,30	179,50	197,17	225,95	173,19	210,67	225,25
T500	Fêmea	254,17	279,95	141,83	175,58	238,79	236,53	186,43	218,83	199,17
T1000	Macho	234,39	211,31	213,46	179,00	191,21	190,03	173,13	250,33	272,17
T1000	Fêmea	212,25	298,84	174,73	199,42	191,33	210,71	212,18	213,92	199,00
<i>Efeito</i>	Tratamento	-4,68	-22,58	24,03	11,67	-26,71	-30,87	12,84	17,38	23,38
	Sexo	-15,10	-46,06	47,60	-8,25	-20,87	-15,63	-26,14	14,12	49,63
	Interação	37,24	-41,47	-8,87	-12,17	20,75	-5,05	-12,90	22,29	23,54
<i>CV(%)</i>		24,10	36,59	33,37	19,84	30,55	31,16	32,74	25,28	31,46

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação.

No caso das plaquetas, este aumento permaneceu até a quarta aplicação, o pode ter ocorrido em resposta à liberação de fatores que estimulam a agregação plaquetária, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator transformador de crescimento (TGF) β -1, porém sem risco de coagulação do sangue, tal como mencionado em humanos por Valacchi & Bocci (1999).

Ao avaliar a resposta *in vitro* de plaquetas de porquinhos da índia (*Cavia porcellus*) expostos a diferentes concentrações de ozônio, Wright *et al.* (1994), observaram que quanto mais elevada era a concentração do gás, maior o estímulo para a liberação do fator ativador de plaquetas (PAF).

TABELA 13 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre a gama glutamiltransferase ($U L^{-1}$) em cada período de aplicação.

Gama glutamiltransferase ($U L^{-1}$)										
Combinções		Período de aplicação de ozônio								
Dosagem	Sexo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
T500	Macho	11,92	16,80	16,07	8,48	10,63	11,26	9,77	10,51	9,45
T500	Fêmea	5,37	9,06	8,64	5,53	5,69	5,54	5,98	6,30	8,85
T1000	Macho	11,64	18,78	16,82	12,69	11,98	13,92	11,02	12,81	10,85
T1000	Fêmea	21,81	27,94	26,22	16,00	18,13	16,26	15,42	16,09	13,09
Efeito	Dosagem	8,08	10,43	9,16	7,34	6,90	6,69	5,34	6,05	2,82
	Sexo	-1,81	-0,71	-0,99	-0,18	-0,60	1,69	-0,31	0,47	-0,82
	Interação	-8,36	-8,46	-8,41	-3,12	-5,55	-4,03	-4,09	-3,75	-1,42
CV(%)		97,23	81,09	75,96	84,52	87,13	77,64	80,90	73,06	70,79

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação.

O aumento na concentração de GGT após a segunda e terceira aplicação, pode ser decorrente de esforço muscular cardíaco (Martínez, *et al.*, 2000, Hinchcliff *et al.*, 2004) propiciado pela ação do ozônio, pelo aumento do fluxo sanguíneo e, pelo débito cardíaco, como também mencionado por Bocci (1994b) em humanos. O ozônio também pode aumentar os níveis do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e cortisol no sangue (Gracer & Bocci, 2005), ocasionando um efeito inotrópico positivo, além de aumentar a atividade hepática pela relação dessas substâncias com a glicogenólise neste órgão. Cabe ressaltar que, quando utilizada a menor dose, os valores médios de GGT foram inferiores durante o período experimental.

Com relação a resposta da glicose à ozonioterapia (Tabela 14), foi observada interação ($p < 0,05$) entre os fatores dosagem e sexo, sobre a concentração desta, após realizada a quarta aplicação da mistura do gás, observando-se que nos machos a dose menor foi capaz de promover a diminuição ($p < 0,05$) na concentração da glicose, ao contrário das fêmeas, que no mesmo período de aplicação, necessitou da dose mais alta (1000 mL) para apresentar este efeito hipoglicemiante. Além disso, foi observado que após realizada a sexta aplicação, ocorreu resposta à ozonioterapia influenciada pelo sexo ($p < 0,05$) sobre os valores médios da glicose, onde os machos mostraram os menores valores médios. Como estas respostas só foram observadas em dois momentos ao longo do período experimental, elas foram consideradas como não relevantes. Por outro lado, cabe ressaltar que, se observou um discreto aumento nas fêmeas, depois de realizada a segunda aplicação de ozônio, o que provavelmente poderia estar relacionado a um estímulo hormonal, possivelmente associado ao aumento de cortisol. Segundo Gracer & Bocci (2005) este efeito pode ocorrer após autohemotransfusão em humanos.

TABELA 14 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre a glicose (mg dL^{-1}) em cada período de aplicação.

		<i>Glicose (mg dL^{-1})</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	93,96	93,97	85,75	84,35	81,00	79,08	79,67	79,50	80,33
T500	Fêmea	94,78	102,75	96,83	90,82	87,17	86,50	85,33	84,17	89,00
T1000	Macho	98,23	97,17	86,58	87,94	82,00	79,50	90,67	89,83	85,67
T1000	Fêmea	86,90	93,83	93,83	81,22	78,33	81,17	85,67	77,75	79,00
<i>Efeito</i>	Dosagem	-1,80	-2,86	-1,08	-	-	-2,46	5,67	1,96	-
	Sexo	5,25	-2,73	-9,17	0,13	-1,25	-	-	3,71	-1,00
	Interação	6,07	6,06	1,92	6,60*	4,92	2,88	5,33	8,38	7,67
<i>CV(%)</i>		6,82	5,80	9,42	4,23	5,91	3,55	11,00	11,21	7,75

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação. * Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Aproximadamente a partir da terceira aplicação da mistura do gás, os valores médios de glicose diminuíram inclusive de forma consistente nos grupos que

receberam a menor dose, sendo claramente perceptível que os valores médios neste período foram inferiores aos iniciais, o que sugere um efeito hipoglicemiante do ozônio nos eqüinos estudados, que segundo a literatura científica (Al-Dalien *et al.*, 1999; Barroetabeña *et al.*, 2002), se deve ao estímulo da utilização da glicose no metabolismo celular. Este achado deve ser levado em consideração quando utilizada a ozonioterapia.

Quando avaliada a concentração do fibrinogênio (Tabela 15) observou-se uma resposta à ozonioterapia diferenciada pela dosagem ($p < 0,05$), já na primeira e segunda aplicação, sendo que quando instituída apenas a menor dose, independente do sexo do animal, se conseguiram valores médios maiores na concentração deste parâmetro.

Após a segunda aplicação, ocorreu uma interação entre dosagem e sexo ($p < 0,05$), refletindo esta os valores médios maiores nas fêmeas que receberam 500 mL da mistura do gás. Já nos machos, este efeito foi observado após administração da dose mais elevada. Entretanto, apesar dos resultados terem sido interessantes, não foi uma resposta consistente.

TABELA 15 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem de ozônio e sexo sobre o fibrinogênio (mg dL^{-1}) em cada período de aplicação.

		<i>Fibrinogênio (mg dL^{-1})</i>								
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicação de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	139,44	131,59	129,57	133,43	138,62	137,98	149,88	127,97	137,88
T500	Fêmea	136,28	136,17	141,98	131,54	148,58	149,83	155,75	145,05	143,44
T1000	Macho	122,37	130,56	159,53	134,91	141,34	126,38	145,47	147,60	150,54
T1000	Fêmea	125,23	114,75	139,62	141,24	144,25	159,46	148,87	143,70	145,74
<i>Efeito</i>	Dosagem	-14,06*	-11,23*	13,80	5,59	-0,81	-0,98	-5,65	9,14	7,48
	Sexo	0,15	5,62	3,75	-2,22	-6,44	-22,47	-4,63	-6,59	-0,38
	Interação	-3,02	10,19*	16,16	-4,11	3,53	-10,62	1,23	10,49	5,18
<i>CV(%)</i>		4,53	5,27	16,99	10,51	13,27	20,39	7,62	13,11	7,75

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás. Sexo (-): fêmeas; dosagem (-): 500 mL. CV: coeficiente de variação. * Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Ainda assim, estes dados são importantes quando a ozonioterapia for utilizada em processos de reparação tissular em eqüinos, já que o aumento na concentração deste parâmetro é fundamental para o processo de cicatrização, sendo esta terapia já

utilizada em outras espécies com essa finalidade (Wright, *et al.*, 1994; Verrazzo, *et al.*, 1995; Sánchez, *et al.*, 1998).

CONCLUSÕES

Nas condições da presente estudo experimental e com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Existem pequenas diferenças, significativas ou não, nas respostas diferenciadas pelos sexos ou dosagens estudadas, para os parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais, linfócitos, basófilos, monócitos e plaquetas) e da bioquímica sanguínea (creatina quinase, gama glutamiltransferase).
2. Em alguns parâmetros hematológicos (segmentados, bastonetes e eosinófilos) e da bioquímica sanguínea (glicose e fibrinogênio), pode ocorrer interação entre os fatores sexo e dosagem, mas de ordem relativamente baixa.
3. Existe influência determinada pelo sexo em resposta a ozonioterapia sobre a concentração dos eritrócitos nas fêmeas.
4. A exposição de equinos sadios a 500 e 1000 mL da mistura terapêutica de ozônio, mediante autohemotransfusão não acarreta alterações clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DALIEN, S.M.; MENÉNDEZ S.; MARTÍNEZ, G.; FERNÁNDEZ-MONTEQUÍN, J.I; CANDELARIO, E.J.; LEÓN, O.S. Ozone therapy effects in the oxidative stress associated to diabetes mellitus. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.18, n.1, p.29-31, 1999.
- 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 eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, p.433-437, 2004.
- BARROETABEÑA A.R.; SÁNCHEZ A.A.; GUERRA J. M. Acción del aceite ozonizado sobre el proceso inflamatorio en heridas de piel de animales de experimentación. **Corr. Med. Cient. Holg.**, v.6, n.2, p.1-10, 2002.
- BOCCI, V. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. **J. Int. Med. Res.**, v.22, n.3, p.131-144, 1994a.
- BOCCI, V. A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the early phase with ozonotherapy (autohaemotherapy). How inflammatory cytokines may have a therapeutic role. **Mediators Inflamm.**, v.3, n.5, p.315-321, 1994b.
- BOCCI, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators Inflamm.**, v.13, n.1, p.3-11, 2004.
- CAMPS, A.M.R.; ELIAS-CALLES, B.; DENIS, R.; LABRADA, A.; SANTANA, K.; SUÁREZ, K. Utilización del oleozon como alternativa de tratamiento en medicina veterinaria y su impacto en la salud animal. In: FORUM DE CIENCIA Y TECNICA, 15, 2003, La Habana. **Memorias...** La Habana: Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad de Granma, 2003. 6p.
- CASALECCHI, F.L. **Digestibilidade aparente total de dietas com milho submetido a diferentes processamentos e resposta glicêmica em eqüinos.** Pirassununga, SP: USP, 2003. 48p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2003.
- CLAVO, B.; PÉREZ, J.L.; LÓPEZ, L.; SUÁREZ, G.; LLORET, M.; RODRÍGUEZ, V.; MACÍAS, V.; SANTANA, M.; MORERA, J.; FIUZA, D.; ROBAINA, F.; GÜNDEROTH, M. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. **J. Altern. Complement. Med.**, v.9, n.2, p.251-256, 2003.
- ČEBULJ-KADUNC, N.; BOŽIČ, M.; KOSEC, M.; CESTNIK, V. The Influence of Age and Gender on Haematological Parameters in Lipizzan Horses. **J. Vet. Med. A.** v.49, n.4, p.217-221, 2002.

- DEATON, C.M.; MARLIN, D.J.; SMITH, N.C.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; SCHROTER, R.C.; KELLY, F. J. Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. **Equine Vet. J.**, v.37, n.3, p.243-249, 2005.
- DÍAZ, A.B.; GARCÍA, M.M.; PIÑA, MENÉNDEZ, S.C. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes con enfermedades vasculares periféricas: informe preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.20, n.1, p.45-47, 2001.
- DUCUSSIN, R.J.; NISHIMURA, M.; SARASHINA, T.; USUKA, Y.; TANABE, S.; OTANI, M. Phagocytosis of bovine blood and milk polymorphonuclear leukocytes after ozone gas administration *in vitro*. **J. Vet. Med. Sci.**, v.65, n.4, p.534-539, 2003.
- FERNANDES, W.R. Avaliação clínica do sistema circulatório. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária**, n.19, p.69-75, 1997.
- FILIPPI, A. Influence of ozonised water on the epithelial wound healing process in the oral cavity. In: OZONE WORLD CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- GILL, J.; WANSKA, E. Seasonal changes in erythrocyte, hemoglobin and leukocyte indexes in barren mares of thoroughbred horses. **Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.**, v.26, n.5, p.347-353, 1978.
- GIUNTA, R.; COPPOLA, A.; LUONGO, C.; SAMMARTINO, A.; GUASTAFIERRO, S.; GRASSIA, A.; GIUNTA, L.; MASCOLO, L.; TIRELLI, A.; COPPOLA, L. Ozonized autohemotransfusion improves, hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Ann. Hematol.**, v.80, n.12, p.745-748, 2001.
- GRACER, R.I.; BOCCI, V. Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process? **Medical Hypotheses.**, v.65, n.4, p.752-759, 2005.
- GUERRA, X.V.; LIMONTA, Y.N.; CONTRERAS, I.H.; FREYRE, R.L.; RAMÍREZ, A.M.P. Resultados de los costos en ozonoterapia. **Rev. Cubana Enfermer.**, v.15, n.2, p.104-108, 1999.
- HERNÁNDEZ, O.D.; GONZÁLEZ, R.C. Ozonoterapia en úlceras flebostáticas. **Rev. Cubana Cir.**, v.40, n.2, p.123-129, 2001.
- HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; GEOR, R.J. **Equine sports medicine and surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Philadelphia: Saunders, 2004. 1364p.
- MARGALIT, M.; ATTIAS, E.; ATTIAS, D.; ELSTEIN, D.; ZIMRAN, A.; MATZNER, Y. Effect of ozone on neutrophil function *in vitro*. **Clin. Lab. Haem.**, v.23, n.4, p. 243-247, 2001.

- MARTÍNEZ, R.; SCAGLIONE, M.C.; LUNEBURG, C.; HERNÁNDEZ, E.; ARANEDA, O.; GONZÁLEZ, M.; ESTRADA, M.; WHITE, A. Cambios sanguíneos y sudorales en equinos sometidos a carreras de resistencia. **Av. Cienc. Vet.**, v.15, n.1-2, p.19-30, 2000.
- MATSUMOTO, A.; SAKURAI, S.; SHINRIKI, N.; SUZUKI, S.; MIURA, T. Therapeutic effects of ozonized olive oil in the treatment of intractable fistula and wound after surgical operation. In: WORLD OZONE CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- MÉNDEZ, N.I.P.; MENÉNDEZ, S.C.; RIVERO, J.W. Ozonoterapia en SIDA. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.24, n.1, p.69-71, 2005.
- NAZIFI, S.; SAEB, M.; KHOSHVAGHTI, A. Studies on the relationship between haemoglobin types of adult Turkoman horses and the concentrations of haemoglobin, copper, ceruloplasmin and iron. **Comp. Clin. Path.**, v.12, n.1, p.53-56, 2003.
- NOA, M.; HERNÁNDEZ, F.; HERRERA, S.; MENÉNDEZ, S.; CAPOTE, A.; AGUILAR, C. Morphological observations in rats treated with ozone by intramuscular applications. In: OZONE WORLD CONGRESS, 10, 1991, Monaco. **Proceedings...** Monaco: International Ozone Association, 1991. 940p.
- OGATA, A.; NAGAHATA, H. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, n.7, p.681-686, 2000.
- OHTSUKA, H.; OGATA, A.; TERASAKI, N.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Changes in leukocyte population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 68, n.2, p.175-178, 2006.
- PÉREZ, N.I.M.; FERNÁNDEZ, J.L.C.; CEPERO, S.M. Ozonoterapia en el síndrome de malabsorción intestinal secundario a parasitismo por *Giardia lamblia*: Estudio preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.22, n.3, p.145-149, 2003.
- PLOPPER, C.G.; DUAN, X.; BUCKPITT, A.R.; PINKERTON, K.E. Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lungs of rats exposed for 90 days or 20 months. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.127, n.1, p.124-131, 1994.
- SÁNCHEZ, A.A.; DÍAZ, R.P.; RODRÍGUEZ, G.G.; LEYVA, S.E.; DÍAZ, S.E.; BORREGO, P.L. Acción del aceite ozonizado sobre la cicatrización de heridas de piel en animales de experimentación. **Rev. CENIC Cienc. Biol.**, v.29, n.3, p.181-184, 1998.
- SCHALM, O.W.; JAIN N.C.; CARROLL, E.J. **Veterinary hematology**. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975. 807p.

- SCROLLAVEZZA, P.; ABBONDI, M.; POGLIACOMI, B.; GUARESCHI, D.; DALL'AGLIO, R.; POLDI, R.; PEZZOLI, G. Ozone treatment in mastitis, metritis and retention of fetal membranes in the dairy cow. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF OZONE APPLICATIONS, 2, 1997, Havana. **Proceedings...** Havana: Centro de Investigaciones del Ozono, 1997. 76p.
- SPEIRS, V. C. **Exame clínico de eqüinos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda, 1999. 366p.
- STEIN, R.B.S. **Avaliação de métodos para determinação da digestibilidade aparente utilizando farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) em eqüinos**. Pirassununga, SP: USP, 2002. 69p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2002.
- TERASAKI, N.; OGATA, A.; OHTSUKA, H.; TAMURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Changes of immunological response after experimentally ozonated autohemoadministration in calves. **J. Vet. Med. Sci.**, v.63, n.12, p.1327-1330, 2001.
- TURRENT, J.; MENÉNDEZ, S. Ozone therapy: experiences in critically ill patients. In: OZONE WORLD CONGRESS, 15, 2001, London, England. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- VALACCHI, G.; BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. **Mediators Inflamm.**, v.8, n.4-5, p.205-209, 1999.
- VERRAZO, G.; COPPOLA, L.; LUONGO, C.; SAMMARTINO, A.; GIUNTA, R.; GRASSIA, A.; RAGONE, R.; TIRELLI, A. Hyperbaric oxygen, oxygen-ozone therapy, and rheologic parameters of blood in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Undersea Hyperb. Med.**, v.22, n.1, p.17-22, 1995.
- VIEBAHN, R. The biochemical processes underlying ozone therapy. **Ozone: Sci. Eng.**, v.7, n.4, p.275-285, 1985.
- WRIGHT, D.T.; ADLER, K.B.; AKLEY, N. J.; DAILEY, L.A.; FRIEDMAN, M. Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.127, n.1, p.27-36, 1994.
- ZIMRAN, A.; WASSER, G.; FORMAN, L.; GELBART, T.; BEUTLER, E. Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. **Acta Haematol.**, v.102, n.3, p.148-151, 1999.

CAPITULO V

COMPORTAMENTO, MONITORAMENTO E EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SOBRE A FREQUÊNCIA CARDÍACA E RESPIRATÓRIA DE EQUÍNOS NO PERÍODO DE RECUPERAÇÃO

RESUMO

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2006. **Efeitos da ozonioterapia sobre parâmetros clínicos, hematológicos e da bioquímica sanguínea em eqüinos.** Orientadora: Maria Verônica de Souza, Co-Orientadores: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

O objetivo deste estudo foi monitorar, *in vivo*, o comportamento, tendências e efeitos do ozônio, sobre parâmetros fisiológicos, como frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) durante o período de recuperação (até 20 minutos após a ozonioterapia). Para isso, foram utilizados 12 eqüinos mestiços, sendo 6 machos e 6 fêmeas, com idades compreendidas entre 4 e 20 anos. Os animais foram submetidos a ozonioterapia, mediante administração de 500 ou 1000 mL da mistura do gás, por via intravenosa, a cada três dias, por um período total de 24 dias. Antes, porém, foram divididos em quatro grupos: MT500, MT1000, FT500 e FT1000, sendo machos (M) que receberam 500 mL e 1000 mL e, fêmeas (F) que receberam 500 e 1000 mL, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que houve aumento na FC ($p > 0,05$) e FR ($p < 0,05$) em todos os eqüinos expostos ao ozônio, independente do sexo, dose ou da interação destes fatores. Transcorridos o período de recuperação, os valores médios desses parâmetros diminuíram, o que é indício de que a terapia ajuda no condicionamento cárdio-respiratório dos eqüinos.

Palavras chave: ozônio, cavalos, exame físico, condicionamento.

ABSTRACT

HADDAD, Melissa Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2006. **Effects of ozone therapy on equine clinical, hematological and blood biochemistry parameters.** Adviser: Maria Verônica de Souza, Co-Advisers: John Jairo Hincapié, José Dantas Ribeiro Filho e Laércio dos Anjos Benjamim.

The objective of this study was to monitor, *in vivo*, pattern, tendency and effect of ozone therapy over heart (HR) and respiratory (RR) rates during the recovery period (up to 20 minutes after ozone therapy). Twelve cross bred horses, 6 males and 6 females, between 4 and 20 years old were exposed to ozone therapy through the application of 500 and 1000 mL of the gas mixture, intravenously, every three days, for 24 days. Four groups were conformed: MT500, MT1000, FT500 and FT1000, which comprised males (M) and females (F) receiving 500 and 1000 mL of ozone, respectively. The results revealed an increase in HR ($p>0.05$) and RR ($p<0.05$) in all horses exposed to ozone, independent on sex, dose or the interaction between these factors. After the recovery period, the HR and RR mean values decreased, fact that could imply preconditioning on the horses cardiorespiratory performance.

Keywords: ozone, horses, physical exam, conditioning.

INTRODUÇÃO

Os eqüinos sejam atletas ou incorporados em rotinas de trabalho realizam esforços musculares que demandam um adequado condicionamento, para evitar o desgaste e lesões decorrentes de um manejo inadequado.

A determinação dos valores de frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) pode ser útil na avaliação do desempenho e condicionamento físico dos eqüinos, determinados em conjunto com outras variáveis. Não existem na literatura científica, artigos que demonstrem a eficácia da ozonioterapia no condicionamento de eqüinos atletas. Em geral, os trabalhos fazem referência ao condicionamento frente ao estresse oxidativo que a terapia oferece. Em alguns aspectos, os efeitos da ozonioterapia são similares a aqueles efeitos decorrentes de um exercício de baixo impacto tanto em animais como na espécie humana. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento e monitorar os valores de frequência cardíaca e respiratória, assim como verificar os efeitos da ozonioterapia sobre estes parâmetros em eqüinos.

REVISÃO DE LITERATURA

O poder oxigenante do ozônio é superior ao do oxigênio, uma vez que estimula diferentes sistemas enzimáticos protetores do organismo (Díaz *et al.*, 2001). Mais especificamente no sangue, melhora a circulação sangüínea através dos capilares, mediante discreto aumento da pressão arterial, assim como das propriedades reológicas do sangue, aumentando a capacidade de distribuição e absorção do oxigênio nos eritrócitos (Pérez *et al.*, 2003).

Está descrita na literatura científica a concentração terapêutica adequada do ozônio em humanos (Bocci 1994; Al-Dalien *et al.*, 1999; Zee & De Monte, 2001; Tylicki *et al.*, 2003; Zamora *et al.*, 2005), porém a aplicação da ozonioterapia em medicina veterinária ainda é muito limitada. Sabe-se dos efeitos nos aspectos hemorreológicos e como esta terapia melhora a circulação sangüínea (Carreira & Almagro, 2000; Giunta *et al.*, 2001; Bocci & Aldinucci, 2004), mas não existem relatos sobre a ação do ozônio sobre parâmetros clínicos.

Os sinais de intoxicação pelo ozônio descritos na espécie humana são os seguintes: tosse, congestão nasal, irritação das vias aéreas superiores, dor na região peitoral, dificuldade ou dor ao respirar, falta de ar, dor de cabeça, fadiga, mudanças no campo visual, epífora, diminuição na frequência cardíaca e na pressão arterial. Por outro lado, todos esses efeitos dependem da dose e da exposição prolongada ao ozônio (González *et al.*, 1999).

Além dos parâmetros sangüíneos básicos para a determinação do bom condicionamento físico do animal, como o hematócrito e o lactato, é importante o acompanhamento do comportamento de variáveis como FC e FR, já que estas oferecem um panorama do condicionamento e resposta física do animal (Barker & Warren-Smith, 2005; Cottin *et al.*, 2005).

Segundo Lekeux & Art (1994), a FR reflete a troca gasosa, que é a principal função do sistema respiratório, sendo expressa pelo número de movimentos respiratórios por minuto (rpm). Na opinião de Speirs (1999), a FR na espécie equina pode variar entre 18 a 20 rpm. Já Silva *et al.* (2005), consideram que durante o período de repouso o equino pode apresentar entre 12 e 20 rpm.

A FC é expressa pelo número de batimentos por minuto (bpm) (Clayton, 1991), variando entre 25 e 50 bpm no equino em repouso. Speirs (1999) relata valores entre 30 a 40 bpm para a espécie equina.

Fatores como dor, aumento da temperatura corporal e o exercício elevam a FR (Clayton, 1991). Já a FC pode aumentar por problemas psicossomáticos (Fernandes, 1997), dor, afecções (Clayton, 1991), entre outros.

O exercício de baixo impacto tem sido associado a modificações nos aspectos hemorreológicos, mais especificamente na fluidez do sangue em animais sob adequado manejo de treinamento. Durante o exercício, ocorre a vasodilatação periférica, que favorece a máxima distribuição de oxigênio. Entretanto, também é importante que este sangue tenha a fluidez suficiente para percorrer os vasos sangüíneos com mínima resistência, assim a deformabilidade e agregação eritrocitária também têm um importante papel na melhoria da circulação para o tecido muscular e outras regiões em que o aporte de oxigênio é fundamental para a realização da atividade física. Em contrapartida, o exercício acarreta um estímulo adrenérgico que promove a contração esplênica, levando ao aumento do hematócrito, da contagem eritrocitária e, conseqüentemente, da viscosidade do sangue, o que pode ocasionar redução no transporte de oxigênio. Além disso, fatores intrínsecos dos eritrócitos como agregação e deformabilidade, também influenciam na resistência do fluxo sangüíneo (Stoiber *et al.*, 2005). Porém, ao se aplicar ozônio nos animais se produz uma vasodilatação e, conseqüentemente, diminuição da agregação eritrocitária, pelo que o aumento na contagem destas células não seria um fator limitante no desempenho do animal. Na opinião de Birchard (1997), como o ozônio acarreta aumento no fluxo sangüíneo para o coração, um maior trabalho é exercido pelas fibras musculares cardíacas. Nesse sentido, a freqüência cardíaca poderia ser aumentada em função deste fenômeno, para favorecer o transporte do oxigênio aos tecidos, tal como descrito por Stoiber *et al* (2005). Evans & Rose (1988) mencionam que o aumento da freqüência cardíaca em eqüinos Puro Sangue de Corrida pode estar relacionado com o volume de oxigênio utilizado pelo animal, sendo acompanhado por um aumento na freqüência respiratória.

Está descrita na literatura científica a concentração terapêutica adequada do ozônio em humanos (Bocci 1994; Al-Dalien *et al.*, 1999; Zee & De Monte, 2001; Tylicki *et al.*, 2003; Zamora *et al.*, 2005), porém a aplicação da ozonioterapia em medicina veterinária ainda é muito limitada. Sabe-se dos efeitos nos aspectos hemorreológicos e como esta terapia melhora a circulação sangüínea (Carreira & Almagro, 2000; Giunta *et al.*, 2001; Bocci & Aldinucci, 2004), assim como outros efeitos terapêuticos ao instituir a mesma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhum momento do período experimental, os animais demonstraram incômodos ou alteração do comportamento durante a ozonioterapia ou imediatamente após a mesma, assim como após as atividades diárias.

Durante avaliação clínica diária os eqüinos não apresentaram sinais de alteração, encontrando-se todos com parâmetros clínicos dentro dos considerados como de referência para a espécie eqüina. Os valores médios de temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória foram de 37,01 °C, 34 bpm e de 24 rpm, respectivamente. As mucosas se mantiveram de coloração rosáceas e úmidas e a taxa de preenchimento capilar inferior a dois segundos, tal como descrito por Speirs (1999), para a espécie eqüina. Entretanto, um dos animais apresentou um ferimento acidental, que ocorreu na época da oitava aplicação.

Um discreto aumento da frequência cardíaca e/ou respiratória poderia ser observado, já que o estresse pode elevar estes parâmetros (Fernandes, 1997).

Durante a aplicação do ozônio, foi possível escutar, sem a utilização de estetoscópio, os movimentos intestinais dos animais, particularmente 5 minutos após o início da aplicação da mistura do gás. Além disso, todos os animais defecavam ao redor de meia hora após a aplicação do ozônio, o que pode sugerir estímulo ou ação do ozônio sobre os mecanismos do trato gastrointestinal. Pérez *et al.* (2003) avaliaram pacientes humanos com a síndrome de má absorção intestinal causada por *Giardia lamblia* tratados com ozonioterapia, no entanto os autores não mencionaram achado semelhante ao nosso.

Comportamento da frequência cardíaca e respiratória antes e durante o período de recuperação após a aplicação de ozônio em eqüinos

Considerou-se tempo de recuperação aquele decorrido até 20 minutos depois de realizada a aplicação da mistura de ozônio e oxigênio.

A finalidade de se avaliar o comportamento foi verificar a existência de alguma modificação nos parâmetros avaliados ao longo do tempo, para em seguida realizar estudos mais específicos.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram a baixa ($p > 0,05$) incidência de efeito da ozonioterapia no tempo de recuperação sobre a FC ao longo do período

de aplicações do ozônio. Nota-se que o grupo das fêmeas que recebeu 500 mL da mistura do gás apresentou aumento da FC em 0,4 bpm após o quarto período de aplicação, e redução em 0,3 bpm após a nona administração do ozônio (Tabela 1). Já quando as fêmeas receberam 1000 mL da mistura do gás, a FC aumentou em 0,8 bpm, após o quarto período de aplicação.

Com relação à FR, observa-se influência ($p < 0,05$) da ozonioterapia no tempo de recuperação. Em todos os grupos, independente da dose e do sexo, houve uma tendência ao aumento da FR no referido tempo. Estes resultados demonstram o esforço aumentado do sistema respiratório dos animais em estudo.

Monitoramento da frequência cardíaca e respiratória antes e imediatamente após ozonioterapia em eqüinos

A tendência dos valores médios de frequência cardíaca, antes de cada aplicação do ozônio, nos quatro grupos avaliados, foi de diminuição (Figura 1), já que com o passar do tempo os animais já estavam adaptados à rotina instituída para a ozonioterapia, que foi realizada pelos mesmos técnicos, durante todo o período experimental, o que certamente reduziu o estresse nos animais, que poderia vir a estimular, por uma descarga adrenérgica, a liberação de hormônios que induziriam uma resposta inotrópica positiva (aumento do débito cardíaco e, conseqüentemente, da frequência cardíaca), conforme descrito por Spinosa *et al.* (2002) e Cottin *et al.* (2005).

Transcorridos até 10 minutos da administração do ozônio, observou-se uma maior variabilidade nos valores médios de FC (Figura 2), inclusive com uma tendência a valores máximos, considerados como normais para a espécie eqüina, que segundo a literatura científica (Speirs, 1999; Orsini & Divers, 2003) pode variar entre 28 e 44 bpm.

Todos os grupos apresentaram uma diminuição na FC após as primeiras três aplicações, provavelmente porque ainda eram baixas as concentrações da mistura do gás no organismo. Adicionalmente, tanto os machos como as fêmeas que receberam a menor dose (500 mL), mostraram valores mais próximos ao limite médio calculado.

TABELA 1 - Estimativas dos parâmetros frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) em função do tempo de recuperação (T) para cada combinação (tratamento x sexo) e período de aplicação.

<i>Parâmetros</i>	<i>Combinação Tratamento x Sexo</i>	<i>Período de Aplicação</i>	<i>Equação de Regressão</i>	<i>R²</i>	
<i>FC</i>	MT500	1-9	$\bar{Y} = 30,67$	-	
		FT500	1-3;5-8	$\bar{Y} = 34,48$	-
			4	$\hat{Y} = 28,6667+0,40000*T$	0,92
			9	$\hat{Y} = 34,3333-0,30000*T$	0,96
	MT1000	1-9	$\bar{Y} = 36,40$	-	
		FT1000	1-3;5-9	$\bar{Y} = 37,67$	-
			4	$\hat{Y} = 30,7778+0,76667*T$	0,97
<i>FR</i>	MT500	1	$\hat{Y} = 17,6667+0,50000*T$	0,75	
		2	$\hat{Y} = 10,6667+0,80000*T$	0,92	
		3	$\hat{Y} = 12,3333+0,30000*T$	0,96	
			4-7;9	$\bar{Y} = 16,93$	-
			8	$\hat{Y} = 14,3333+0,50000*T$	0,99
			FT500	1;3;5-9	$\bar{Y} = 24,99$
			2	$\hat{Y} = 17,3333+0,14000*T$	0,97
			4	$\hat{Y} = 13,0000+1,10000*T$	0,98
			MT1000	1;3;7-9	$\bar{Y} = 27,47$
			2	$\hat{Y} = 13,0000+0,90000*T$	0,96
			4	$\hat{Y} = 18,0000+1,20000*T$	0,75
			5	$\hat{Y} = 15,6667+0,90000*T$	0,91
	FT1000		6	$\hat{Y} = 12,0000+0,40000*T$	1,00
			1;3;5-6	$\bar{Y} = 27,00$	-
			2	$\hat{Y} = 12,3333+1,70000*T$	0,88
			4	$\hat{Y} = 14,6667+1,40000*T$	0,90
			7	$\hat{Y} = 10,6777+0,80000*T$	0,92
			8	$\hat{Y} = 13,3333+1,00000*T$	0,95
		9	$\hat{Y} = 12,0000+0,60000*T$	1,00	

T = tempo de recuperação em minutos. MT500: machos tratados com 500 mL, MT1000: machos tratados com 1000 mL, FT500: fêmeas tratadas com 500 mL, FT1000: fêmeas tratadas com 1000 mL.

*: Significativo pelo teste t (p<0,05)

Este aumento na frequência cardíaca após 10 minutos da aplicação da mistura do gás pode ser decorrente do aumento no fluxo sanguíneo, por regulação no diâmetro vascular. Segundo Birchard (1997), a resposta vascular, em equinos, é dependente de

valores adequados de hematócrito, débito cardíaco e de alterações na viscosidade do fluxo sanguíneo.

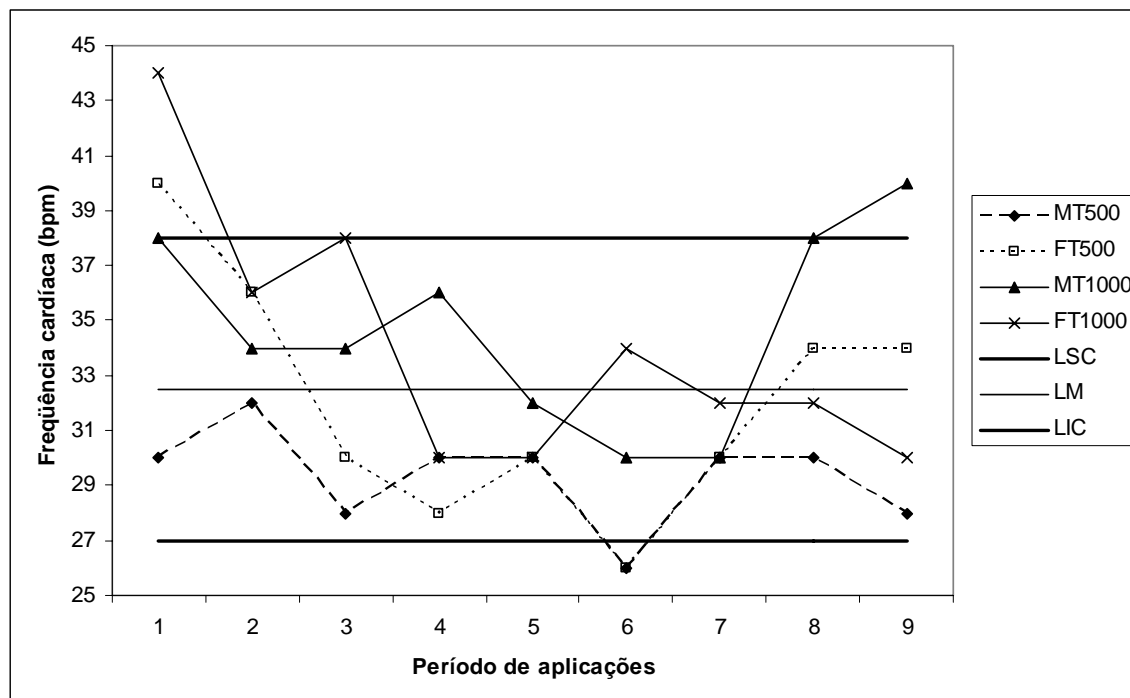


FIGURA 1 – Estimativas da frequência cardíaca (bpm) imediatamente antes de cada aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.

A diminuição da viscosidade do sangue, que leva a um aumento no débito cardíaco, é decorrente da ação do ozônio sobre componentes celulares do sangue, como plaquetas e eritrócitos, ativando as primeiras para a inibição da liberação de fatores de coagulação, diminuindo a agregação plaquetária. Estes efeitos já foram demonstrados por Wright *et al.* (1994) em cobaias, assim como por Valacchi & Bocci (1999) e Díaz *et al.* (2001) em humanos. Por outro lado, os eritrócitos também são afetados na sua permeabilidade de membrana, com alteração na sua elasticidade, o que permite uma otimização da circulação sanguínea, como mencionado na literatura científica (Zimran *et al.*, 1999; Gornick & Gutsze, 2000; Giunta *et al.*, 2001). No endotélio a reação é para a liberação do óxido nítrico, permitindo uma vasodilatação, por atuar na regulação do diâmetro vascular (Bocci & Aldinucci, 2004).

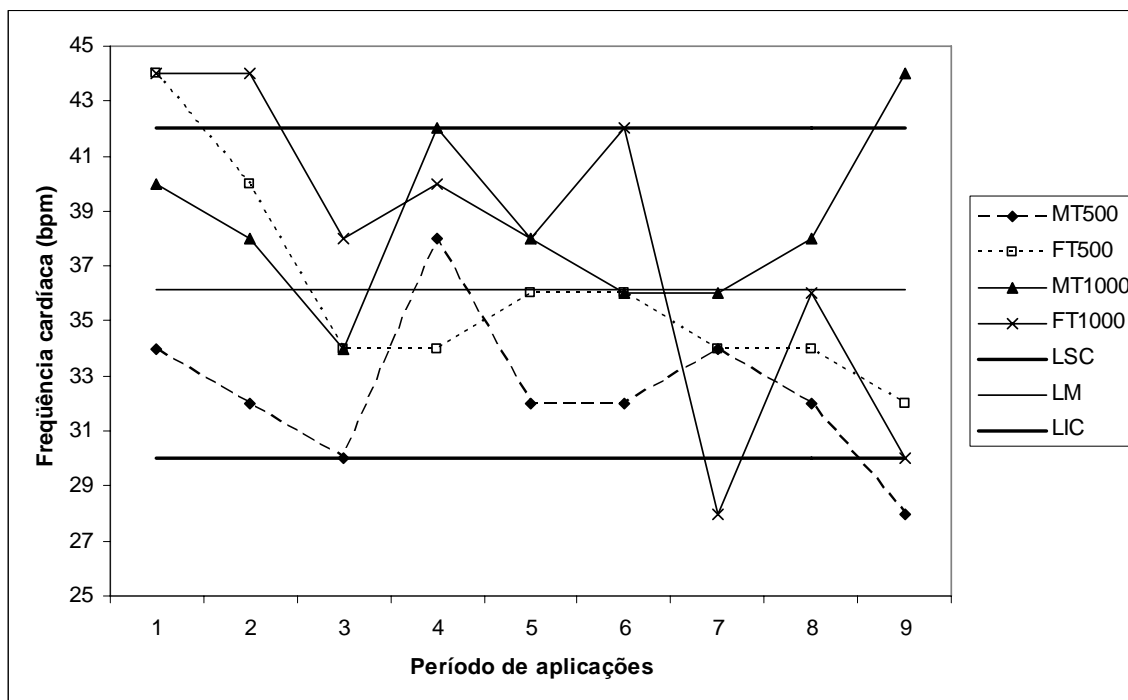


FIGURA 2 – Estimativas da frequência cardíaca (bpm) até 10 minutos depois da administração do ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.

Tendo transcorrido até 20 minutos após a administração do ozônio, observa-se que a variabilidade continua entre os grupos durante o período experimental, porém os limites desta variabilidade são menores (Figura 3), quando comparados com os limites da FC até 10 minutos após a terapia. Isto indica uma possível adaptação à terapia, além do que existe uma tendência à redução nos valores de FC, o que demonstra um discreto condicionamento no esforço cardíaco.

Evans (2000) e Gómez *et al.* (2004), mencionaram que a FC é um bom indicador de adaptação em diferentes intensidades de exercício em equinos. Na opinião de Evans (2000) se após 30 minutos de realizado exercício, a FC mostra-se elevada, é sinal de estresse, seja pela não adaptação ao trabalho ou por distúrbio metabólico. Este autor descreve, em diferentes raças de equinos de esporte, como um aumento nos valores do hematócrito, eritrócitos e hemoglobina, eleva a capacidade de transporte de oxigênio. Sendo assim, ao aumentar o fluxo sanguíneo, a FC também aumenta, para que ocorra de maneira mais eficiente a distribuição do oxigênio para os

tecidos, principalmente para o músculo esquelético de equinos de esporte e trabalho. Adicionalmente, Evans (2000), relata a importância da FC como fator limitante para a determinação do máximo consumo de oxigênio pelo animal, já que este, originado dos pulmões, será impulsionado pelo coração para a circulação sanguínea, para finalmente chegar aos tecidos-alvo.

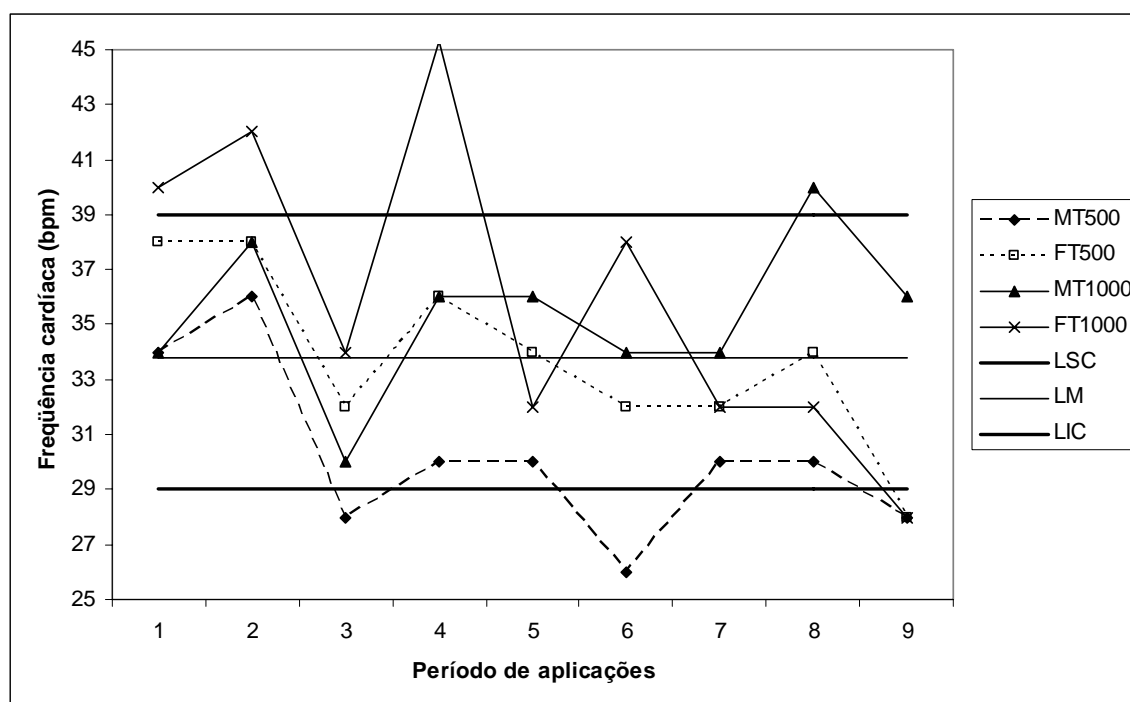


FIGURA 3 – Estimativas da frequência cardíaca (bpm) até 20 minutos depois da administração de ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.

Gómez *et al.* (2004), compararam a FC de equinos de salto da raça Holsteiner, em diferentes tempos após realização de exercício, com os valores iniciais de repouso. Os autores demonstraram que a FC diminuía paulatinamente no decorrer do período experimental. Estes resultados indicaram a adaptação dos equinos à exigência do programa de treinamento imposto, e demonstraram que quando um equino sob a mesma exigência de esforço apresenta uma menor FC, indica que o animal está

impulsionando uma determinada quantidade de sangue com menor esforço, ressaltando a sua aptidão física.

Teixeira-Neto *et al.* (2004), compararam a FC em eqüinos de enduro, no tempo de repouso e em diferentes tempos de avaliação, após realização de exercício. Os autores descrevem o aumento da FC após a chegada dos animais ao local de avaliação, porém depois de transcorridos 10 minutos, houve recuperação dos valores da FC, que se assemelham aos do tempo de repouso, demonstrando o adequado condicionamento dos eqüinos para aquele nível de esforço.

Monitorando a frequência respiratória imediatamente antes da administração do ozônio, se observa que os valores médios se mantiveram próximos aos valores do limite médio de controle (Figura 4), na maior parte do período experimental.

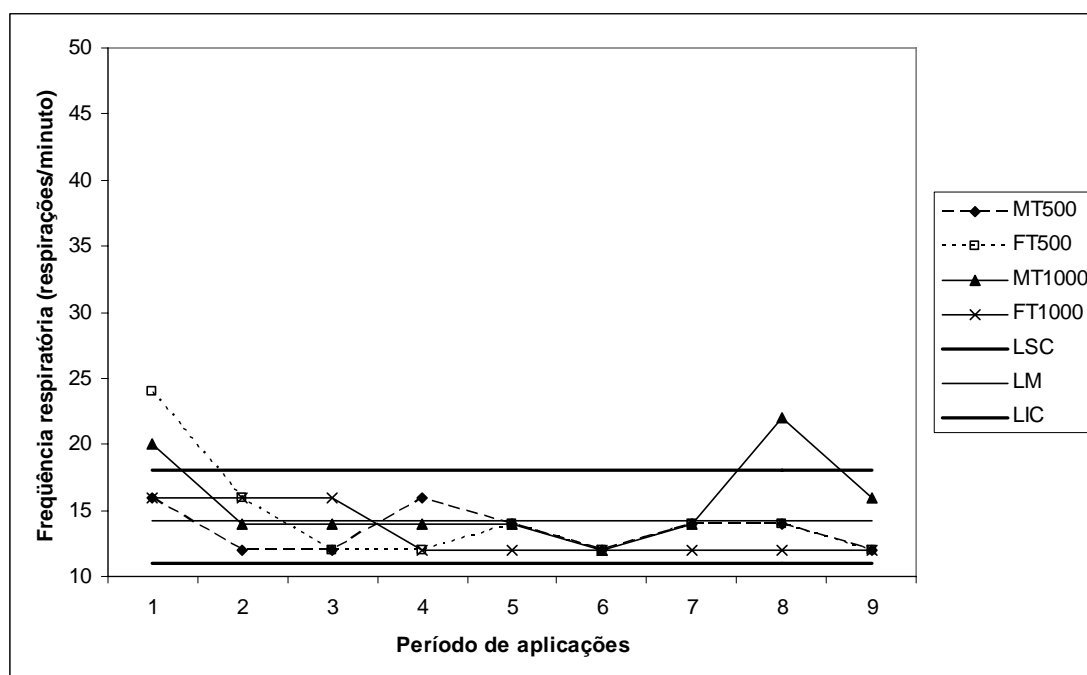


FIGURA 4 – Estimativas da frequência respiratória (rpm) imediatamente antes da administração do ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.

Tendo transcorrido 10 minutos da administração do ozônio observou-se variação nos dados e como os limites máximos de FR aumentaram (Figura 5) com relação àqueles obtidos antes da aplicação da mistura do gás.

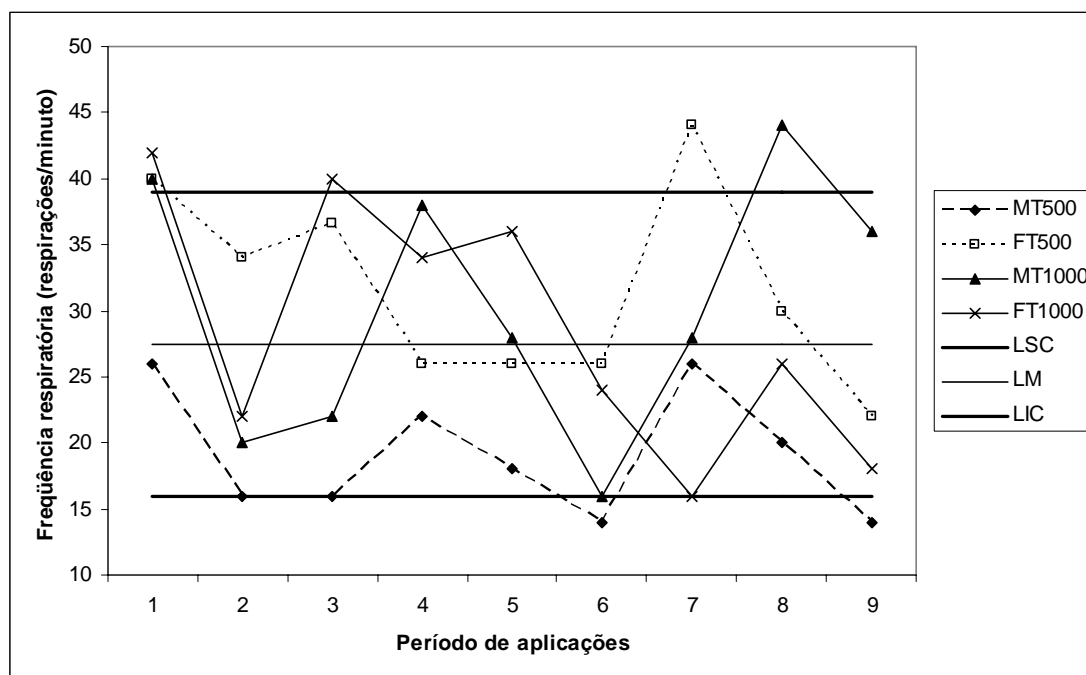


FIGURA 5 – Estimativas da frequência respiratória (rpm) até 10 minutos depois da administração de ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.

Os machos que receberam 500 mL da mistura do gás, apresentaram valores mais baixos de FR em comparação com os demais grupos em estudo. Nas fêmeas que receberam esta mesma dose a FR reduziu no terço médio do período experimental, com posterior elevação. Por outro lado, o grupo de fêmeas tratadas com 1000 mL de ozônio, apresentaram valores mais altos de FR na primeira metade do período de aplicações, com posterior redução nos valores, que se mostraram inferiores aos do limite médio de controle.

Depois de transcorridos 20 minutos da administração do ozônio nos equinos, os valores médios da FR se encontraram praticamente similares aos obtidos nos 10 minutos do tempo de recuperação, porém com menor flutuação, mostrando um padrão

mais similar entre os grupos (Figura 6), com diminuição da FR após o quinto período de aplicação que, a exceção do MT1000, os demais grupos apresentaram valores médios inferiores no final do período experimental, quando comparados aos valores iniciais.

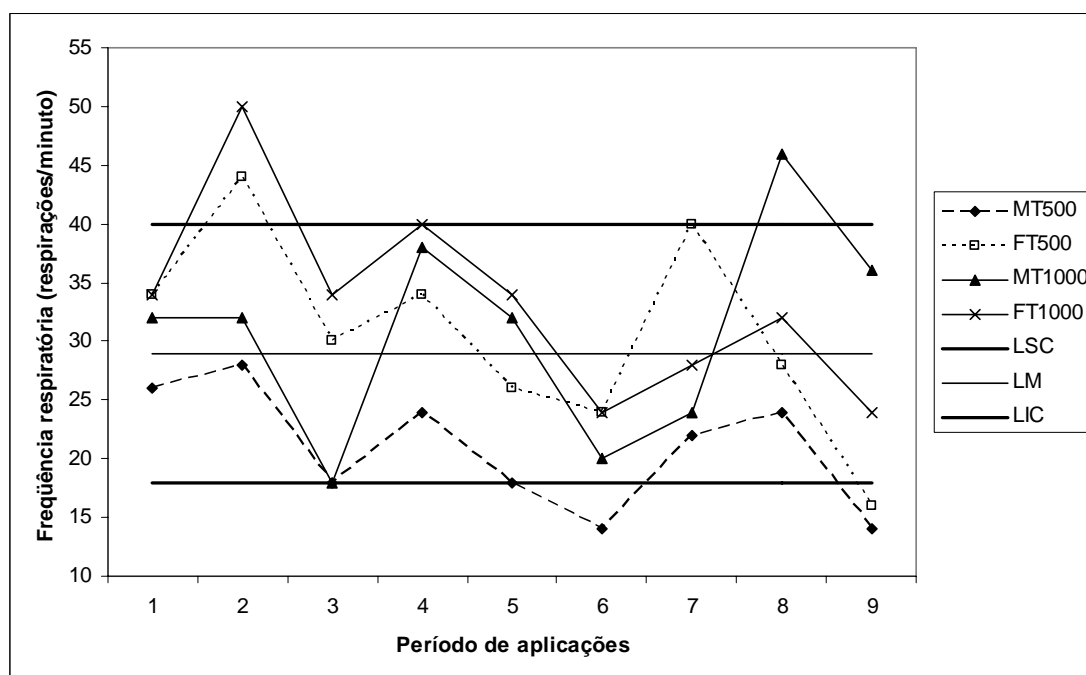


FIGURA 6 – Estimativas da frequência respiratória (rpm) até 20 minutos depois da administração do ozônio em cada período de aplicação. MT500 (machos tratados com 500 mL), FT500 (fêmeas tratadas com 500 mL), MT1000 (machos tratados com 1000 mL) e FT1000 (fêmeas tratadas com 1000 mL). LSC: limite superior de controle, LM: limite médio, LIC: limite inferior de controle.

Estes dados demonstram o condicionamento dos animais, pela diminuição da FC anteriormente mencionada, como da FR, já que no decorrer do período experimental ocorre uma elevação na FC e FR até 10 minutos após a terapia, no entanto apesar destes valores serem maiores do que os iniciais, depois de transcorridos 20 minutos, os animais recuperaram estas frequências, atingindo valores similares aos iniciais. Com isto, demonstram a adaptação ao esforço cardio-respiratório estimulado pela ozonioterapia.

Evans (2000) menciona que uma quantidade maior de oxigênio arterial aumenta o consumo máximo do mesmo. No caso do animal em exercício, este

aumento na oferta de oxigênio, se deve à contração esplênica, aumentando o número de eritrócitos, o hematócrito e a concentração de hemoglobina no sangue e, conseqüentemente, a capacidade de oxigenação dos tecidos. Neste estudo inferimos efeitos similares em resposta à ozonioterapia; porém, a origem dos eritrócitos provavelmente não seja a contração esplênica, mas sim pelo estímulo do ozônio sobre a granulocitopoiese na medula óssea, tal como mencionado por Remigio *et al.* (1999).

Desta maneira esta capacidade de oxigenação se torna verdadeiramente eficiente, com o aumento da frequência cardíaca, importante na impulsão de sangue rico em oxigênio, até os diferentes tecidos e na elevação da frequência respiratória, fundamental para a troca gasosa.

Gómez *et al.* (2004), acreditam que o treinamento não ocasione um aumento no volume respiratório e sim um incremento na elasticidade pulmonar, de forma que, o tecido pulmonar otimiza a velocidade de troca gasosa alveolar, que com o tempo acarreta aumento da amplitude respiratória. Os autores mencionam que dentro de um programa de treinamento, a diminuição da FR se deve a uma eficiente resposta aeróbica, já que a capacidade de oxigenação melhora com o aumento das células vermelhas e de hemoglobina no sangue. Adicionalmente, a modulação da FR se dá por meio do equilíbrio de quimiorreceptores arteriais presentes na artéria aorta (para pressão parcial de oxigênio) e na artéria carótida (para pressão parcial de dióxido de carbono), o que permite um intercâmbio gasoso mais adequado no suprimento dos diferentes requerimentos metabólicos.

Efeitos da ozonioterapia sobre a frequência cardíaca e respiratória antes e imediatamente após a administração da mistura do gás

Os valores médios de frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) dos equinos sob avaliação, quando administradas as diferentes doses do ozônio, durante todo o período de aplicações, foram de 34 bpm e de 24 rpm respectivamente, sendo estes valores considerados como dentro ou discretamente acima dos limites de referência para a espécie equina, que são de 30 a 40, para a FC e de 8 a 18, para a FR (Speirs, 1999; Orsini & Divers, 2003).

Embora a frequência respiratória estivesse um pouco acima do estabelecido como normal, os animais não demonstraram sinais de desconforto durante as

aplicações da mistura do gás. Adicionalmente, trabalho realizado em equinos sadios da raça Pantaneira demonstrou que estes valores podem oscilar entre 24,8 e 29,3 para a FR no período de repouso (Silva *et al.*, 2005).

Ao avaliar a frequência cardíaca, no dia da terceira aplicação, imediatamente antes da administração do ozônio (Tabela 2), se observam valores diferentes ($p < 0,05$) determinados pela dosagem, onde aqueles animais que receberiam 1000 mL da mistura do gás, apresentaram as maiores médias. Porém, este achado não foi considerado relevante neste momento do estudo, já que os animais se encontravam em repouso e não tinham recebido a aplicação do ozônio. Estes dados demonstram a normalidade da frequência cardíaca antes de começar cada aplicação nos grupos experimentais, o que esteve presente durante todo o período de aplicações.

TABELA 2 – Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência cardíaca (bpm) antes da aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.

<i>Frequência cardíaca antes da ozônioterapia</i>										
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicações de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	30	32	28	30	30	26	30	30	28
T500	Fêmea	40	36	30	28	30	26	30	34	34
T1000	Macho	38	34	34	36	32	30	30	38	40
T1000	Fêmea	44	36	38	30	30	34	32	32	30
<i>Efeitos</i>	<i>Dosagem</i>	6,00	1,00	7,00*	4,00	1,00	6,00	1,00	3,00	4,00
	<i>Sexo</i>	-8,00	-3,00	-3,00	4,00	1,00	-2,00	-1,00	1,00	2,00
	<i>Interação</i>	2,00	1,00	-1,00	2,00	1,00	-2,00	-1,00	5,00	8,00

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás.

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Quando avaliada a frequência cardíaca imediatamente após (até 10 minutos) a aplicação do ozônio (Tabela 3), observa-se após a segunda aplicação uma resposta à ozônioterapia influenciada ($p < 0,05$) pela dosagem e sexo sobre os valores médios da frequência cardíaca. Nesse sentido, quando foram administrados 1000 mL da mistura do gás se observaram os maiores valores médios deste parâmetro. Com relação ao sexo, as fêmeas foram as mais responsivas, independente da dose utilizada, elevando os valores médios deste parâmetro. Também foram observados em alguns momentos,

valores discretamente acima daqueles de referência para a espécie. No entanto, ao longo do experimento, este parâmetro se manteve com valores menores a partir do quinto período de aplicação, quando comparados com os valores iniciais. Adicionalmente, a FC de equinos sadios das raças Brasileiro de Hipismo, Bretã, Puro Sangue de Corrida e de equinos mestiços pode chegar a $44,24 \pm 8,32$, $37,81 \pm 9,72$, $39,41 \pm 7,17$ e $39,37 \pm 8,60$ bpm, respectivamente (Paludo *et al.*, 2002).

TABELA 3 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência cardíaca (bpm) até 10 minutos após a aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.

<i>Frequência Cardíaca até 10 minutos após a ozonioterapia</i>										
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicações de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	34	32	30	38	32	32	34	32	28
T500	Fêmea	44	40	34	34	36	36	34	34	32
T1000	Macho	40	38	34	42	38	36	36	38	44
T1000	Fêmea	44	44	38	40	38	42	28	36	30
<i>Efeitos</i>	<i>Dosagem</i>	3,00	5,00*	4,00	5,00	4,00	5,00	-2,00	4,00	7,00
	<i>Sexo</i>	-7,00	-7,00*	-4,00	3,00	-2,00	-5,00	4,00	0,00	5,00
	<i>Interação</i>	3,00	1,00	0,00	-1,00	2,00	-1,00	4,00	2,00	9,00

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás.

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Apesar da baixa variabilidade nos valores médios de FC, esta pode ser um processo de adaptação à ozonioterapia e decorrente de aplicações contínuas com uma baixa concentração de ozônio, resultando em um menor esforço cardíaco. Este processo de adaptação já foi descrito por Bocci & Aldinucci (2004) em pacientes humanos.

Gibbs *et al.* (1995), mencionaram que quando a frequência cardíaca não retorna aos seus valores normais em um determinado tempo, pode indicar inadequado condicionamento do animal, resultando em muitos casos em fadiga muscular e, conseqüentemente o aparecimento de lesões.

A FC pode aumentar em decorrência de mudanças reológicas no sangue, decorrentes da interação dos seus componentes com o ozônio, aumentado desta forma a fluidez do sangue e o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, o débito cardíaco

(Carreira & Almagro, 2000; Zee & De Monte, 2001; Barroetabeña *et al.*, 2002; Machin *et al.*, 2004). A viscosidade diminui em resposta à diminuição e alteração transitória e estrutural do fibrinogênio, assim como devido à ativação das plaquetas pelo ozônio, reduzindo a quantidade de cálcio citosólico nesses componentes e, assim, diminuindo a sua agregação, além de reduzir fatores de crescimento relacionados com a coagulação, como o fator de crescimento e transformação Beta 1 (TGF β -1) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (Zee & De Monte, 2001; Toros *et al.*, 2005). O aumento do óxido nítrico a partir das células endoteliais aumenta o fluxo sanguíneo e regula o diâmetro vascular, o que também pode elevar o esforço cardíaco, imediatamente após a exposição ao ozônio (Valacchi & Bocci, 2000; Zee & De Monte, 2001; Bocci & Aldinucci, 2004). Também existe a reação na membrana dos eritrócitos, aumentando sua filtrabilidade e melhorando sua atividade reológica (Barroetabeña *et al.*, 2002).

Segundo Cottin *et al.* (2005), um maior alongamento das fibras cardíacas do ventrículo esquerdo, reduz a resistência do miocárdio, aumentando a frequência cardíaca com conseqüente aumento no débito cardíaco.

Depois de transcorridos até 20 minutos após a aplicação do ozônio (Tabela 4), observou-se efeito da ozonioterapia de maneira diferenciada ($p < 0,05$) determinada pelo sexo, após a primeira aplicação, momento no qual a frequência cardíaca nas fêmeas se mostrou com os valores médios mais altos, independente da dose administrada. Após a oitava aplicação, observou-se novamente efeito da terapia, sendo neste período determinada por uma interação ($p < 0,05$) entre os fatores sexo e dosagem; momento em que os machos apresentaram uma menor alteração quando utilizada a dose de 500 mL de ozônio. Por outro lado, este efeito foi apenas observado em dois períodos de aplicação, não sendo assim considerado relevante.

A exceção dos machos tratados com 1000 mL do ozônio, observou-se no final do período de estudo, que os valores médios da FC foram menores do que os iniciais, o que pode ser por adaptação e/ou melhora no rendimento cardíaco dos animais com a ozonioterapia. Na opinião de Gibbs *et al.* (1995), a determinação da FC no período de recuperação após exercício em equinos é de relevante consideração, já que permite reconhecer o início de fadiga muscular mediante a avaliação da frequência cardíaca.

TABELA 4 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência cardíaca (bpm) até 20 minutos da aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.

<i>Frequência cardíaca até 20 minutos após a ozonioterapia</i>										
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicações de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	34	36	28	30	30	26	30	30	28
T500	Fêmea	38	38	32	36	34	32	32	34	28
T1000	Macho	34	38	30	36	36	34	34	40	36
T1000	Fêmea	40	42	34	45	32	38	32	32	28
<i>Efeitos</i>	Dosagem	1,00	3,00	2,00	7,67	2,00	7,00	2,00	4,00	4,00
	Sexo	-5,00*	-3,00	-4,00	-7,67	0,00	-5,00	0,00	2,00	4,00
	Interação	-1,00	-1,00	0,00	-1,67	4,00	1,00	2,00	6,00*	4,00

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás.

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Ao avaliar a frequência respiratória (Tabela 5), antes das aplicações do ozônio, não foram constatadas diferenças ($p > 0,05$) nos valores médios dos animais em estudo, influenciadas pelo tratamento, sexo ou a interação destes durante o período experimental.

TABELA 5 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência respiratória (rpm) antes da aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.

<i>Frequência respiratória antes da ozonioterapia</i>										
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicações de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	16	12	12	16	14	12	14	14	12
T500	Fêmea	24	16	12	12	14	12	14	14	12
T1000	Macho	20	14	14	14	14	12	14	22	16
T1000	Fêmea	16	16	16	12	12	12	12	12	12
<i>Efeitos</i>	Dosagem	-2,00	1,00	3,00	-1,00	-1,00	0,00	-1,00	3,00	2,00
	Sexo	-2,00	-3,00	-1,00	3,00	1,00	0,00	1,00	5,00	2,00
	Interação	6,00	1,00	-1,00	-1,00	1,00	0,00	1,00	5,00	2,00

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás.

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Nesse período de avaliação, os animais estavam em repouso e não tinham recebido ozônio, por conseguinte, estes dados demonstram a normalidade da frequência respiratória nos animais dos diferentes grupos experimentais.

Quando avaliado o mesmo parâmetro até 10 minutos após cada aplicação do ozônio (Tabela 6), nota-se que quando realizada a terceira aplicação, existiu um efeito ($p < 0,05$) da ozonioterapia sobre a FR influenciado pelo sexo. Neste período, as fêmeas apresentaram frequência respiratória mais elevada, sendo bem acima dos considerados como normais para a espécie equina (Speir, 1999; Orsini & Divers, 2003; Silva *et al.*, 2005). Entretanto, este efeito somente foi constatado nesta aplicação, pelo que foi considerado como de pouca relevância, embora na maioria dos períodos de aplicação as fêmeas apresentaram valores médios de FR mais elevados.

TABELA 6 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência respiratória (rpm) até 10 minutos após a aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.

<i>Frequência respiratória até 10 minutos após a ozonioterapia</i>										
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicações de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	26	16	16	22	18	14	26	20	14
T500	Fêmea	40	34	37	26	26	26	44	30	22
T1000	Macho	40	20	22	38	28	16	28	44	36
T1000	Fêmea	42	22	40	34	36	24	16	26	18
<i>Efeitos</i>	<i>Dosagem</i>	8,00	-4,00	4,67	12,00	10,00	0,00	-13,00	10,00	9,00
	<i>Sexo</i>	-8,00	-10,00	-19,33*	-0,00	-8,00	-10,00	-3,00	4,00	5,00
	<i>Interação</i>	6,00	8,00	1,33	4,00	-0,00	2,00	15,00	14,00	13,00

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás.

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

Este aumento imediato na FR pode ter sido decorrente de uma maior necessidade em se intensificar as trocas gasosas, processo descrito por Evans (2000) e Gómez *et al.* (2004) em equinos. Segundo Hinchcliff *et al.* (2004), isto ocorre em equinos atletas, com a finalidade de melhorar o transporte de oxigênio que aumenta em decorrência de um maior débito cardíaco, pelo aumento na quantidade dos eritrócitos, o que acarreta um maior volume de oxigênio disponível para o consumo e distribuição nos diferentes tecidos. Estes autores também mencionam a importância

do trabalho em sincronia do aparelho cardiovascular e respiratório, que permitem a distribuição de oxigênio. Birchard (1997) também faz referência acerca do aumento na capacidade de transportar oxigênio com o aumento do hematócrito e do débito cardíaco, o que resulta em uma resposta respiratória, com melhora na distribuição do oxigênio nos tecidos.

Ao se avaliar os valores médios da FR em até 20 minutos após a aplicação do ozônio (Tabela 7), observa-se que houve uma resposta ($p < 0,05$) à ozonioterapia determinada pelo sexo após a segunda e terceira aplicações, períodos em que as fêmeas revelaram valores médios mais altos deste parâmetro, em comparação com os machos, independente da dose de ozônio utilizada (500 ou 1000 mL). Apesar desta resposta ($p < 0,05$), somente em dois períodos de aplicação do ozônio, pode ser constatado que os valores médios de FR nas fêmeas durante quase todo o período experimental, se mantiveram mais altos.

TABELA 7 - Médias e estimativas dos efeitos principais e da interação da dosagem e sexo sobre a frequência respiratória (rpm) até 20 minutos após a aplicação do ozônio, considerando os dias de aplicação.

<i>Frequência respiratória até 20 minutos após a ozonioterapia</i>										
<i>Combinações</i>		<i>Período de aplicações de ozônio</i>								
<i>Dosagem</i>	<i>Sexo</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
T500	Macho	26	28	18	24	18	14	22	24	14
T500	Fêmea	34	44	30	34	26	24	40	28	16
T1000	Macho	32	32	18	38	32	20	24	46	36
T1000	Fêmea	34	50	34	40	34	24	28	32	24
<i>Efeitos</i>	<i>Dosagem</i>	3,00	5,00	2,00	10,00	11,00	3,00	-5,00	13,00	15,00
	<i>Sexo</i>	-5,00	-17,00*	-14,00*	-6,00	-5,00	-7,00	-11,00	5,00	5,00
	<i>Interação</i>	3,00	-1,00	-2,00	4,00	3,00	3,00	7,00	9,00	7,00

T500: tratamento com 500 mL da mistura do gás. T1000: tratamento com 1000 mL da mistura do gás.

* Significativo pelo teste F ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo experimental e com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Após ozonioterapia ocorre aumento na frequência respiratória, com posterior redução da mesma no decorrer das aplicações.
2. A quantidade de ozônio administrada por autohemotransfusão, assim como o sexo dos animais não são fatores relevantes que influenciam na alteração das frequências cardíaca e respiratória em função da ozonioterapia.
3. Animais tratados com ozonioterapia apresentam um adequado condicionamento cardio-respiratório, sendo possivelmente uma opção para melhorar o desempenho de eqüinos atletas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DALIEN, S.M.; MENÉNDEZ S.; MARTÍNEZ, G.; FERNÁNDEZ-MONTEQUÍN, J.I; CANDELARIO, E.J.; LEÓN, O.S. Ozone therapy effects in the oxidative stress associated to diabetes mellitus. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.18, n.1, p.29-31, 1999.
- BARKER, A.B.E.; WARREN-SMITH AK. A comparison of fitness between horses with different exercise history. **AFBM J.** v.2, n.1, p.17-23, 2005
- BARROETABEÑA A.R.; SÁNCHEZ A.A.; GUERRA J. M. Acción del aceite ozonizado sobre el proceso inflamatorio en heridas de piel de animales de experimentación. **Corr. Med. Cient. Holg.**, v.6, n.2, p.1-10, 2002.
- BIRCHARD, G. F. Optimal hematocrit: theory, regulation and implications. **Amer. Zool.**, v.37, n.1, p.65-72, 1997.
- BOCCI, V. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. **J. Int. Med. Res.**, v. 22, n.3, p.131-144, 1994.
- BOCCI, V.; ALDINUCCI, C. Rational bases for using oxygen-ozonotherapy as a biological response modifier in sickle cell anemia and β -thalassemia: A therapeutic perspective. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v.18, n.1, p.38-44, 2004.
- CARREIRA, V.P.; ALMAGRO, Z.E.U. Efectividad del oleozón en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. **Rev. Cubana Estomatol.**, v.37, n.3, p.140-145, 2000.
- CASALECCHI, F.L. **Digestibilidade aparente total de dietas com milho submetido a diferentes processamentos e resposta glicêmica em equinos.** Pirassununga, SP: USP, 2003. 48p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2003.
- CLAYTON, H.M. **Conditioning sport horses.** Mason: Sport Horse Publications, 1991. 242p.
- COTTIN, F.; MÉDIGUE, C.; LOPES, P.; PETIT, E.; PAPELIER, Y.; BILLAT, V.L. Effect of exercise intensity and repetition on heart rate variability during training in elite trotting horse. **Int. J. Sports Med.**, v.26, n.10, p.1-9, 2005.
- DÍAZ, A.B.; GARCÍA, M.M.; PIÑA, MENÉNDEZ, C.S. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes con enfermedades vasculares periféricas: informe preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.20, n.1, p.45-47, 2001.
- DÍAZ, S.L.; GONZÁLEZ, J.M.; GONZÁLEZ, Y.H.; WONG, R. Estudio de pacientes sometidos a ozonoterapia mediante el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales. **Anuario Toxicología**, v.1, n.1, p.88-92, 2001.

- EVANS, D.L. **Training and fitness in athletic horses**. Barton: Rural Industries Research and Development Corporation, 2000. 65p.
- EVANS, D.L.; ROSE, R.J. Cardiovascular and respiratory responses in Thoroughbred horses during treadmill exercise. **J. Exp. Biol.**, v.134, n.1, p.397-408, 1988.
- FERNANDES, W.R. Avaliação clínica do sistema circulatório. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária**, n.19, p.69-75, 1997.
- GARCÍA, M.; GUZMÁN, R.; CABEZAS, I.; MERINO, V.; PALMA, C.; PÉREZ, R. Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas. **Arch. Med. Vet.**, v. 31, n.2, p.167-176, 1999.
- GIBBS, P.G.; POTTER, G.D.; NIELSEN, B.D.; HOUSEHOLDER, D.D.; MOYER, W. **Scientific principles for conditioning race and performance horses**. Texas A & M University, 1995. 14p.
- GIUNTA, R.; COPPOLA, A.; LUONGO, C.; SAMMARTINO, A.; GUASTAFIERRO, S.; GRASSIA, A.; GIUNTA, L.; MASCOLO, L.; TIRELLI, A.; COPPOLA, L. Ozonized autohemotransfusion improves, hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Ann. Hematol.**, v.80, n.12, p.745-748, 2001.
- GONZÁLEZ, Y.; REMIGIO, A.; ZAMORA, Z.; FONSECA, G. Ozonoterapia: efectos genotóxicos en sangre periférica de ratón. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.18, n.1, p.37-39, 1999.
- GÓMEZ, C.; PETRÓN, P.; ANDAUR, M.; PÉREZ, R.; MATAMOROS, R. Medición post-ejercicio de variables fisiológicas, hematológicas y bioquímicas en equinos de salto Holsteiner. **Revista Científica**, v.14, n.3, p.1-19, 2004.
- GÓRNICKI, A.; GUTSZE, A. *In vitro* effects of ozone on human erythrocyte membranes: An EPR study. **Acta Biochim. Pol.**, v.47, n.4, p.963-971, 2000.
- FERNANDES, W.R. Avaliação clínica do sistema circulatório. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária**, n.19, p.69-75, 1997.
- HACKETT, R.P.; DUCHARME, N.G.; GLEED, R.D.; MITCHELL, L.; SODERHOLM, L.V.; ERICKSON, B.K.; ERB, H.N. Do Thoroughbred and Standardbred horses have similar increases in pulmonary vascular pressures during exertion? **Can. J. Vet. Res.**, v.67, n.4, p.291-296, 2003.
- HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; GEOR, R.J. **Equine sports medicine and surgery. Basic and clinical sciences of the equine athlete**. Philadelphia: Saunders, 2004. 1364p.
- LEKEUX, P.; ART, T. **The respiratory system: anatomy, physiology, and adaptations to exercise and training**. In: _____ The athletic horse. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1994. p.79-127.

- MACHÍN V.G.; TURRENT, J.F.; MENÉNDEZ, S.C.; HERNÁNDEZ, A.D. Ozonoterapia y laserpuntura en el tratamiento de la sordera súbita. **Rev. Cubana Cir.**, v.43, n.3-4, p.1-7, 2004.
- ORSINI, J.A.; DIVERS, T.J. **Manual of equine emergencies. Treatment and procedures**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2003. 912p.
- PALUDO, G.R.; McMANUS, C.; DE MELO, R.Q.; CARDOSO, A.G.; MELLO, F.P.; MOREIRA, M.; FUCK, B.H. Efeito do estresse térmico e do exercício sobre parâmetros fisiológicos de cavalos do exercito brasileiro. **R. Bras. Zootec.**, v.31, p.1130-1142, 2002.
- PÉREZ, N.I.M.; FERNÁNDEZ, J.L.C.; CEPERO, S.M. Ozonoterapia en el síndrome de malabsorción intestinal secundario a parasitismo por *Giardia lamblia*: Estudio preliminar. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.22, n.3, p.145-149, 2003.
- REMIGIO A.; GONZÁLEZ, Y.; ZAMORA, Z.; FONSECA, G. ¿Influye la ozonoterapia en la medula ósea? **Ver. Cubana Invest. Biomed.**, v.18, n.1, p.24-26, 1999.
- SCROLLAVEZZA, P.; FERRARI, F.; MARTINI, F.M.; ISOLA, M. Ozone treatment and blood lactate variation after thoroughbred racehorses. In: WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION MONDIAL CONGRESS, 5, 1997, Padova. **Proceedings...** Padova: World Equine Veterinary Association, 1997. 466p.
- SILVA, L.A.C.; SANTOS, S.A.; SILVA, R.A.S.; McMANUS, C.; PETZOLD, H. Adaptação do cavalo pantaneiro ao estresse da lida diária de gado no Pantanal, Brasil. **Arch. Zootec.**, v.54, n. 206-207, p. 509-513, 2005.
- SPEIRS, V. C. **Exame clínico de eqüinos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda, 1999. 366p.
- SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3^a ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002. 752p.
- STEIN, R.B.S. Avaliação de métodos para determinação da digestibilidade aparente utilizando farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) em eqüinos. Pirassununga, SP: USP, 2002. 69p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2002.
- STOIBER, B.; ZACH, C.; IZAY, B.; WINDBERGER, U. Whole blood, plasma viscosity, and erythrocyte aggregation as a determining factor of competitiveness in standard bred trotters. **Clin. Hemorheol. Microc.**, v.32, n.1, p.31-41, 2005.

- TEIXEIRA-NETO, A.R.; FERRAZ, G.C.; MATAQUEIRO, M.I.; LACERDA-NETO, J.C.; QUEIROZ-NETO, A. Reposição eletrolítica sobre variáveis fisiológicas de cavalos em provas de enduro de 30 e 60 km. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1505-1511, 2004.
- TOROS, H.X.; CASTELLANOS, R.; FERNÁNDEZ-BRITTO, J.E. La asociación de dislipidemia y trombosis en la inestabilización de la placa aterosclerótica. **Rev. Cubana Invest. Biomed.**, v.24, n.3, p.1-6, 2005.
- TYLICKI, L.; NIEWEGLOWSKI, T.; BIEDUNKIEWICZ, B.; CHAMIENIA, A.; DEBSKA-SLIZIEN, A.; ALEKSANDROWICZ, E.; LYSIAK-SZYDŁOWSKA, W.; RUTKOWSKI, B. The influence of ozonated autohemotherapy on oxidative stress in hemodialyzed patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs. **Int. J. Artif. Organs**, v.26, n.4, p.297-303, 2003.
- VALACCHI, G., BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. **Mediators Inflamm.**, v.8, n.4-5, p.205-209, 1999.
- VALACCHI, G., BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. **Mediators Inflamm.**, v.9, n.6, p.271-276, 2000.
- WRIGHT, D. T.; ADLER, K. B.; AKLEY, N. J.; DAILEY, L. A.; FRIEDMAN, M. Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.127, n.1, p.27-36, 1994.
- ZAMORA, Z.B.; BORREGO, A.; LÓPEZ, O.Y; DELGADO, R.; GONZÁLEZ, R.; MENÉNDEZ, S.; HERNÁNDEZ, F.; SCHULZ, S. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF- α release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. **Mediators Inflamm.**, v.2005, n.1 p.16-22, 2005.
- ZEE, VAN DER H.; DE MONTE A. Ozone auto-haemotherapy in lower limb ulcerations In: WORLD OZONE CONGRESS, 15, 2001, London. **Proceedings...** London: International Ozone Association, 2001. 1628p.
- ZIMRAN, A.; WASSER, G.; FORMAN, L.; GELBART, T.; BEUTLER, E. Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. **Acta Haematol.**, v.102, n.3, p.148-151, 1999.