

## CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DE ÉGUAS SAUDÁVEIS SUBMETIDAS A OZONIOTERAPIA POR INSUFLAÇÃO RETAL

### TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF HEATHY MARES SUBMITTED TO OZONE THERAPY BY RECTAL INSUFFLATION

<sup>1</sup>MARTINS, Beatriz de Azevedo; <sup>1</sup>GARCIA, Isadora de Almeida; <sup>1</sup>LOPES, Laryssa Eduarda de Campos Lopes; <sup>1</sup> MENDONÇA, Mariana Orlandini; <sup>1</sup>GIUGNI, Mariane; <sup>1</sup>TOROHARA, Mariane; <sup>1</sup>MORAIS, Matheus Nogueira; <sup>1</sup>MARTINS, Tainara de Oliveira; <sup>1</sup>DUARTE, Yasmin Cunha; <sup>2</sup>MONTECHIESI, Daniela Fernandez; <sup>1</sup>ALMEIDA, Breno Fernando Martins; <sup>1</sup>OLIVEIRA, Paula Lima

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária – Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos-Unifio/FEMM

<sup>2</sup>Médica Veterinária Autônoma Fazenda Santa Lúcia

#### RESUMO

A ozonioterapia induz no organismo estresse oxidativo controlado, gerando uma resposta antioxidante, conforme relatos da medicina humana. Após a aplicação do ozônio, ocorre a formação das moléculas reativas de oxigênio, que auxiliam em processos fisiológicos de sinalização e regulação das defesas antioxidantes. O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante total (CAT) de éguas saudáveis submetidas à ozonioterapia por insuflação retal por três dias consecutivos. Foram utilizadas 20 éguas com idades entre 6 e 14 anos, pesando entre 350 e 550kg, divididas em dois grupos. O grupo ozônio (n=10) recebeu por via retal, insuflação da mistura oxigênio-ozônio na dose de 0,125 mg/kg por três dias consecutivos, enquanto o grupo controle não recebeu intervenção alguma. Amostras sanguíneas foram obtidas antes e em sete momentos após a ozonioterapia para avaliação da CAT em fotocolorímetro semiautomático pela redução do cátion ABTS sozinho (CAT-ABTS) ou associado à peroxidase (CAT-ABTS+HRP), redução férrica (CAT-FRAP) e redução cúprica (CAT-CUPRAC). A ozonioterapia promoveu aumento da CAT-ABTS e da CAT-FRAP em relação ao grupo controle e momento basal, enquanto o grupo controle apresentou maior CAT-CUPRAC que o grupo tratado com ozônio no último momento avaliado. Não houve alteração da CAT-ABTS+HRP. Conclui-se que a ozonioterapia realizada por três dias consecutivos induz resposta antioxidante em éguas saudáveis que pode ser determinada dependendo do método de análise.

**Palavras-chave:** Coletas Sanguíneas; Estresse Oxidativo; Insuflação Retal; Ozônio.

#### ABSTRACT

Ozone therapy induces controlled oxidative stress in the body, generating an antioxidant response, according to reports from human medicine. After the application of ozone, reactive oxygen molecules are formed, which help in physiological processes of signaling and regulation of antioxidant defenses. The present study aimed to evaluate the total antioxidant capacity (TAC) of healthy mares submitted to ozone therapy by rectal insufflation for three consecutive days. Twenty mares aged between 6 and 14 years, weighing between 350 and 550 kg were enrolled in the study, divided into two groups. The ozone group (n=10) received rectally, insufflation of the oxygen-ozone mixture at a dose of 0.125 mg/kg for three consecutive days, while the control group did not receive any intervention. Blood samples were obtained before and at different times after ozone therapy to assess TAC in a semiautomatic photocolormeter by reducing the ABTS cation alone (TAC-ABTS) or associated with peroxidase (TAC-ABTS+HRP), ferric reduction (TAC-FRAP) and cupric reduction (TAC-CUPRAC). Ozone therapy promoted an increase in TAC-ABTS and TAC-FRAP in relation to the control group and at baseline, while the control group had a higher TAC-CUPRAC than the group treated with ozone at the last evaluated moment. There was no change in TAC-ABTS+HRP levels. We conclude that ozone therapy performed for three consecutive days induces an antioxidant response in healthy mares that can be determined depending on the method of analysis.

**Keywords:** Blood Collections; Oxidative Stress; Rectal Insufflation; Ozone.

## INTRODUÇÃO

A ozonioterapia utiliza ozônio medicinal ( $O_3$ ), o qual é composto por 95% de oxigênio ( $O_2$ ) e 5% de ozônio (BOCCI, 2006). Essa terapia tem se mostrado capaz de gerar efeitos bactericidas, antivirais, antifúngicos, analgésicos e imunomoduladores (SCHWARTZ; MARTÍNEZ-SANCHEZ, 2012). Quando em contato com o organismo, induz um quadro de estresse oxidativo agudo moderado e apropriado, de caráter transitório, com a finalidade de não causar estresse oxidativo crônico. Ainda provoca a estimulação e ativação do sistema antioxidante, estimulado pequenos e repetidos choque oxidativos, mecanismo a partir do qual o ozônio seria capaz de estimular as enzimas antioxidantes (VENDRUSCULO, 2017; MANOTO et al., 2016).

Em poucos minutos da aplicação, acontece a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que quando produzidas em proporções adequadas, são benéficas para diversos processos fisiológicos. As EROs existem em equilíbrio com as defesas antioxidantes, as quais atuam intensivamente no controle da agressão produzida por essas espécies reativas. Quando há um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os agentes oxidantes no organismo, desencadeia-se um processo chamado estresse oxidativo (SAND, 2005; ALMEIDA et al., 2013).

Para avaliar o estresse oxidativo, são utilizados métodos espectrofotométricos que avaliam a capacidade oxidante total (COT) e a capacidade antioxidante total (CAT), por meio de diferentes metodologias, como a capacidade antioxidante equivalente a Trolox pela redução do cátion ABTS (CAT- ABTS), redução do cátion ABTS associado à peroxidase (CAT-ABTS+HRP), capacidade de redução férrica do plasma (CAT-FRAP) e capacidade antioxidante cúprica redutora (CAT-CUPRAC) (RUBIO et al., 2016a). A CAT mensura todas as substâncias antioxidantes presentes no sangue e a interação entre elas, obtendo-se assim, o *status* antioxidante do indivíduo naquele momento (EREL, 2004).

São escassos estudos que tenham determinado o efeito da ozonioterapia por insuflação retal sobre os marcadores de estresse oxidativo sistêmicos em equinos. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a CAT em éguas saudáveis submetidas a três sessões consecutivas de ozonioterapia por insuflação retal.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos sob protocolo 003/21.

Foram selecionadas 20 éguas, com idade de 6 a 14 anos, pesando entre 350 a 550 kg, todas clinicamente saudáveis, vacinadas, vermifugadas, com controle de endo e ectoparasitas e sem alterações hematológicas e bioquímicas (albumina, aspartato aminotransferase-AST, creatinina, gamaglutamil transferase- GGT, globulina, proteína total e ureia) uma semana antes de inclusão no estudo.

As éguas foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos por sorteio:

- Grupo Ozônio: as éguas receberam, por via retal, insuflação da mistura oxigênio-ozônio na dose de 0,125 mg/kg por três dias consecutivos com 24 horas de intervalo entre as aplicações.
- Grupo Controle: as éguas foram submetidas às mesmas condições de manejo das éguas que receberam ozonioterapia, porém sem intervenção terapêutica e tendo amostras sanguíneas obtidas nos mesmos momentos.

A ozonioterapia foi realizada sempre no mesmo horário do dia em todas as éguas. Inicialmente, todas as éguas tiveram suas ampolas retais esvaziadas manualmente e a aplicação de ozônio ocorreu utilizando sonda uretral de silicone e gerador portátil de ozônio (O&L 1.5, Ozone & Life, SP, Brasil).

As amostras sanguíneas foram obtidas imediatamente antes da terapia (M0), imediatamente antes da segunda sessão de ozônio (M1), imediatamente antes da terceira sessão de ozônio (M2), 1 h após a terceira sessão (M3), e 6 (M4), 10 (M5), 17 (M6) e 30 (M7) dias após o início da terapia com ozônio.

A CAT foi avaliada por quatro diferentes metodologias em fotolorímetro semiautomatizado (BIO 2000, BioPlus, Barueri, SP, Brasil). O primeiro método foi o da capacidade antioxidante equivalente a trolox pela inibição do cátion ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (CAT-ABTS) descrito por Erel (2004). O segundo método foi baseado na redução do cátion ABTS associado à peroxidase (CAT-ABTS+HRP) descrito por Rubio et al. (2016b). O terceiro pela capacidade antioxidante cúprica redutora (CAT-CUPRAC) descrito por Rubio et al. (2016c). E o quarto pela capacidade de redução férrica do plasma (CAT-FRAP) descrito por Benzie e Strain (1996).

As variáveis foram testadas quanto à normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e as diferenças entre os momentos foram verificadas pelos testes de ANOVA com

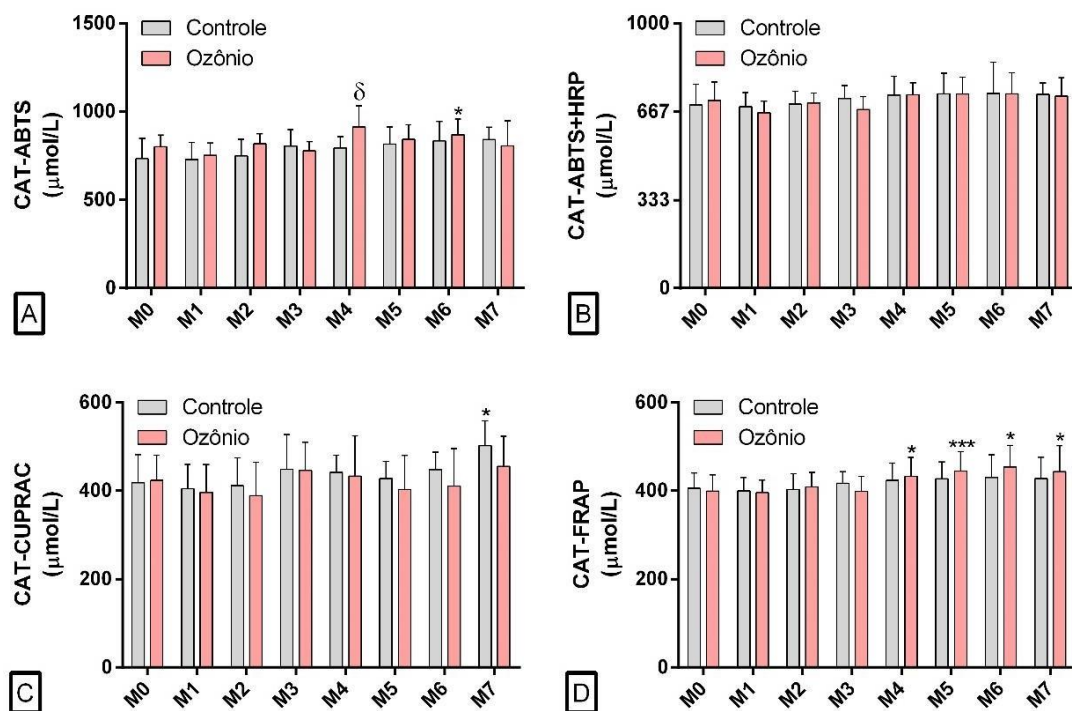
medidas repetidas e pós-teste de Tukey ou Friedman com pós-teste de Dunn. As diferenças entre os grupos em cada momento foram determinadas pelo teste de T ou Mann-Whitney. Todas as análises estatísticas foram efetuadas em programa computacional (GraphPad Prism, v.6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), sendo considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A ozonioterapia por insuflação retal por três dias consecutivos promoveu aumento da CAT-ABTS em M6 em relação ao momento basal, sendo superior ao grupo controle em M4. A TAC-FRAP foi maior nas éguas que receberam ozonioterapia em M4, M5, M6 e M7 em relação ao momento basal. A TAC- CUPRAC do grupo controle apresentou aumento em M7 em relação ao momento basal e não houve alteração da TAC-ABTS+HRP.

Após a sessão de ozonioterapia, houve um aumento da CAT pelos métodos ABTS e FRAP, sem alteração pelo método ABTS+HRP. Diferentemente, Almeida et al. (2021) observaram que a ozonioterapia realizada por via intrauterina por três dias consecutivos causou a redução da CAT-ABTS, CAT-CUPRAC, CAT-FRAP e CAT-ABTS+HRP nos primeiros dias após a insuflação, retornando a valores semelhantes aos basais cerca de duas semanas após a terapia. Entretanto, os autores não observaram elevação da CAT acima dos valores basais. Tsuzuki et al. (2015) observaram aumento da potencial antioxidante biológico após a ozonioterapia por auto-hemoterapia maior. A discrepância entre os resultados utilizando diferentes vias de aplicação da ozonioterapia evidenciam que tais vias de aplicação provavelmente sejam responsáveis pelas diferentes respostas oxidativas observadas entre os autores.

**FIGURA 1** - Capacidade antioxidante total (CAT) determinada pela inibição da redução do cátion ABTS (CAT-ABTS, A), do cátion ABTS associado à peroxidase (CAT-ABTS+HRP, B), redução do cobre (CAT-CUPRAC, C) e redução férrica (CAT-FRAP, D) em éguas controle sem intervenção (n=10) e que receberam três dias consecutivos (intervalos de 24 h) de ozonioterapia por insuflação retal (Ozônio, n=10). As amostras foram obtidas imediatamente antes do tratamento (M0), imediatamente antes da segunda sessão (M1), imediatamente antes da terceira sessão (M2), 1 h após a terceira sessão (M3), e 6 (M4), 10 (M5), 17 (M6) e 30 (M7) dias após o início da terapia com ozônio. Os gráficos são representados por média e desvio padrão e as diferenças estatisticamente significativas são representadas por (\*) quando  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  em relação ao M0 ou por ( $\delta$ ) quando há diferença em relação ao grupo controle no mesmo momento.



## CONCLUSÃO

A ozonioterapia aplicada por insuflação retal em égua saudável por três dias consecutivos desencadeou resposta antioxidante com aumento da CAT. Cabe destacar que tal resposta antioxidante foi dependente do método de análise empregado, destacando que nem todos os métodos são eficazes na avaliação de tal resposta induzida pela ozonioterapia retal.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, L.G.; MELO, L.M.; PREVE, P.P.; BOSCO, A.M.; LIMA, V.M.; CIARLINI, P.C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **Veterinary Journal**, v.198, p.599–605, 2013.

ALMEIDA, B.F.M.; AMATTI, L.Z.; SOUZA, G.G.; GARCIA, L.V.; MONTECHIESI, D.F.; IGNÁCIO, F.S.; OLIVEIRA, P.L.; COSTA, L.R.; FLORIANO, B.P.; BOSCULO,

M.R.M.; JOAQUIM, F.G.F.; RUBIO, C.P. Effect of uterine ozone therapy and anticoagulant sampling on oxidative stress parameters in mares. **Research in Veterinary Science**, v.136, p.503–511, 2021.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70–76, 1996.

BOCCI V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy: State of the art. **Arch Med Res.**, v. 37, n. 4, p. 425-35, 2006.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clin Biochem.**, v.37, p.277–285, 2004.

MANOTO, S. L.; MAEPA, M. J.; MOTAUNG, S. K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 672–679, 2016.

RUBIO, C.P.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J.J. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 166, 2016a.

RUBIO, C.P.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; ARNAO, M.B.; CERON, J.J. Validation of three automated assays for total antioxidant capacity determination in canine serum samples. **J. Vet. Diagn. Investig.**, v.28, p.693–698, 2016b.

RUBIO, C.P.; TVARIJONAVICIUTE, A.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; CERÓN, J.J. Validation of an automated assay for the measurement of cupric reducing antioxidant capacity in serum of dogs. **BMC Veterinary Research**, v.12, p.137, 2016c.

SAND, C. V. **Influência da L-Glutamina exógena nas defesas antioxidantes e na curva de tolerância à glicose, em modelo animal**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2005.

SCHWARTZ, A.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; SCWHARTZ, A. La ozonoterapia y su fundamentación científica. **Revista Española de Ozonoterapia**, v. 2, n. 1, p. 163-98, 2012.

TSUZUKI, N.; ENDO, Y.; KIKKAWA, L.; KOROSUE, K.; KANEKO, Y.; KITAUCHI, A.; KATAMOTO, H.; HIDAKA, Y.; HAGIO, M.; TORISU, S. Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 77, n. 12, p. 1647–1650, 2015.

VENDRUSCULO, C. P. et al. **Avaliação dos efeitos inflamatório e oxidante do ozônio medicina em articulações sinoviais de equinos hípidos**. Curitiba, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2017. Congresso Brasileiro de Buiatria (2017), Foz do Iguaçu. Revista Acadêmica de Ciência Animal, v. 15, supl. 2, p. 35-36, 2017.