

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS**

**EFEITO DA AUTO-HEMOTERAPIA MENOR, AUTO-HEMOTERAPIA
MENOR OZONIZADA E INSUFLAÇÃO RETAL DE OZÔNIO SOBRE
PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DE CÃES HÍGIDOS**

JANE PRADO LEITE MOREIRA

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2015**

JANE PRADO LEITE MOREIRA

**EFEITO DA AUTO-HEMOTERAPIA MENOR, AUTO-HEMOTERAPIA
MENOR OZONIZADA E INSUFLAÇÃO RETAL DE OZÔNIO SOBRE
PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DE CÃES HÍGIDOS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária
da Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia
Veterinárias

Orientadora: Fabiola de Oliveira Paes Leme

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2015

M838e Moreira, Jane Prado Leite, 1981-
Efeito da auto-hemoterapia menor, auto-hemoterapia menor ozonizada e insuflação de ozônio sobre parâmetros hematimétricos e bioquímicos de cães hípidos/ Jane Prado Leite Moreira.-2015.
64p.:il.

Orientadora: Fabiola de Oliveira Paes Leme
Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão- Doenças- Teses. 2. Hematologia Veterinária- Teses. 3. Antioxidantes – Teses. I. Leme, Fabiola de Oliveira Paes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título

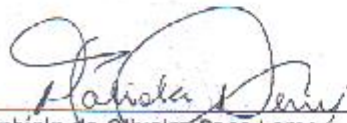
CDD- 636.089 15

FOLHA DE APROVAÇÃO

JANE PRADO LEITE MOREIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 28 de abril de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof^a. Fabiola de Oliveira Paes Leme
Presidente - Orientador



Dr. Vinicius Ricardo Cunha de Souza
Quality Especialidades Veterinárias



Prof^a. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária

Aos animais.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à minha mãe, exemplo de mulher forte, batalhadora e com um coração enorme, que me ensinou a dar valor às pequenas coisas e sempre me apóia na busca dos meus sonhos. Um agradecimento especial também à toda minha pequena grande família: minhas irmãs Janaína Moreira (Zazá), que sempre me incentiva e me ajuda em tudo que preciso e Janine Moreira (Bundinha) que nos trouxe o querido Manoel Machado (Gordo) que é fonte infinita de alegria para todos nós, meu irmãozinho Courte Moreira (Xamego) que sempre está pronto para ajudar, meu tio Almiro Silva (Tio Almiro) que mesmo com aquele jeito durão demonstra seu amor por todos nós e meus avós maternos, Edith e José Silva que foram os pilares de todos nós. Aos meus queridos gatos Josefina e Onofre por todos momentos de descontração, alegria e companheirismo que me dão mesmo sem eu pedir.

Um agradecimento especial à uma das minhas melhores amigas da vida e querida orientadora Dra. Fabíola Paes Leme (Musa), que me ensina muito a cada dia, que sempre alivia minhas preocupações, pressões, tristezas e decepções com presentes, passeios, comida, piadas e palavras sábias e doces, que me ajudou muito na execução do projeto e redação dessa dissertação e que me emprestou suas cadelinhas Lilica e Vanvan como animais experimentais. Os últimos dois anos não teriam sido tão bacanas se tivesse escolhido outra (des)orientadora. Com quem aprendi a fazer desde um projeto de pesquisa a um hemograma, a analisar desde resultados estatísticos ao comportamento masculino, a usar desde uma furadeira e uma serra tico-tico a ferramentas dos programas de computador e aplicativos de celular que eu desconhecia e com quem descobri que pessoas "chama-chuva" existem. Foram tantos aprendizados que fica difícil enumerá-los aqui. Sou eternamente grata. Fui muito esperta e feliz em minha escolha.

Agradeço à amada professora Dra. Adriane Bicalho (Maravilhosa Tia) por sempre estar disposta e disponível para ajudar em todos os momentos, pelas risadas sinceras, por todo o aprendizado que me passou desde a época da graduação, pelo apoio e carinho, por permitir que suas cadelinhas Lilica e Queridinha participassem do experimento, por me receber em sua casa, me ajudar nas coletas e aplicações e por autorizar o uso dos cães da semiologia Baleia, Spock, Tigresa e Thor.

Um agradecimento infinito aos animais que, mesmo sem sua devida autorização, foram utilizados no experimento. Obrigada pela colaboração, pelas abanadas de cauda, lambidas e latidos, mesmo sabendo que iriam passar por momentos de dor ("Mas de novo, tia?"). Obrigada Baleia, Dara, Dentinha, Duque, Hoscha, Jordânia, Laisa, Lana, Lenox, Lilica da Fá, Lilica da Tia, Lorena, Malu, Maria, Mel da Sandra, Mel do Palladino, Queridinha, Sassá, Spock, Thor, Tigresa, Vanessa, Vanvan e Windy, por tudo isso e, literalmente, por doar o sangue à ciência.

Muito obrigada aos proprietários e cuidadores desses animais, Adriane Bicalho, Camila Guerra, Evandro Ribeiro, Claudiney Leite e Jefferson Tavares (Canil Casa da Cinofilia), Fabíola Paes Leme, José Aloysio da Costa Val, Pedro Pyramo, Sandra Matoso e Tatiana Gonçalves pela autorização do uso dos mesmos, por me receberem e me ajudarem com o que precisava.

No âmbito acadêmico agradeço aos professores Dr. Rubens Carneiro e Dr. Álvaro Falcão pela amizade, por sempre me estimularem a ir mais longe e confiarem no meu trabalho.

Aos professores Dr. Júlio César Veado e Dr. Ronald Luz por me receberem de braços abertos e fazerem o possível para me ajudar quando tudo estava dando errado. E também à Dra. Lúcia Marina de Castilho pela amizade e confiança.

Muito obrigada aos meus queridos alunos de Iniciação Científica Pedro Cunha (Pepe) por todo o auxílio em todas as fases da realização desse trabalho e Fernando Oliveira pela ajuda nos outros projetos. Obrigada à aluna de IC que se tornou minha amiga querida Helena Mendes (Helenildes) pela colaboração, parceria, amizade e compreensão. E também à toda equipe do Laboratório de Larvicultura, que me ajudou muito em um momento confuso e difícil pra mim.

Agradeço às residentes de Patologia Clínica da Escola de Veterinária que me ajudaram no processamento das amostras, principalmente à Ayla Watanabe e Isabela Carvalho que foram imprescindíveis na leitura de lâminas, à todos funcionários da escola, estagiários, residentes e médicos veterinários do hospital que me ajudaram de alguma forma.

Aos novos e velhos amigos que sempre me apoiaram. Sem vocês eu não vivo. Especialmente à Elaine Dorneles (Freundin) e família, Fabrícia Burgarelli (Pizinha), Vítor Lopes (Fííítor), Christiane e Douglas Araújo, Francisco Ferreira Júnior, Samanta Laporte (Chatinha), Felipe Matos, Hana Dalila (Hanilda), Sarah Faria, Letícia (Lelete) e Manfred Nöbauer, Sheila Mara (Sheilinda), Francis Vieira (Bubuzento) e Paula Mayer.

Muito obrigada à equipe e aos amigos do CrossFit Ouro Preto, especialmente à Renata Figueiredo (Beú) e ao Coach Cristiano Rigamont, por me aturarem e acharem graça nos meus palavrões, esse é o melhor lugar onde alívio meu estresse. Aos amigos e colegas dos grupos Stammtisch-BH e CS-BH pelos momentos de descontração.

Obrigada também ao médico Veterinário Adriano Caquetti e à cliente e amiga Flávia Negrão de Lima por me apresentar à ozonioterapia e me incentivar a estudar o assunto. Sem vocês nada disso teria iniciado.

Não posso deixar de agradecer às pessoas que, de alguma forma, jogaram "baldes de água fria" nas minhas idéias, solicitações e pedidos. Elas só confirmaram que, quando eu quero, eu consigo.

Obrigada à Escola de Veterinária por me acolher mais uma vez. Ao colegiado de pós-graduação pelo apoio e à FAPEMIG pela bolsa concedida.

“Todas as substâncias são venenos, não existe nada que não seja veneno. Somente a dose
correta diferencia o veneno do remédio”
Paracelso (1493-1541)

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. Introdução	16
2. Revisão de literatura	16
2.1 Estresse oxidativo	16
2.2 Peroxidação lipídica	17
2.3 O gás ozônio	18
2.4 Vias de administração do ozônio medicinal	18
2.5 Resposta antioxidante e ação sistêmica do ozônio	19
2.6 O ozônio como imunomodulador	20
2.7 Toxicidade do ozônio e contraindicações da oxigênio-ozonioterapia	22
2.8 Hematologia	22
2.9. Perfil bioquímico	23
2.9.1 Enzimas séricas e antioxidantes	23
2.9.2 Metabólitos	24
2.9.3 Minerais	26
2.9.4 Proteína total plasmática e Albumina	26
2.9.5 Colesterol e triglicerídeos	27
2.9.6 Glicose	27
3. Materiais e métodos	28
3.1 Animais	28
3.2 Geração do ozônio	28
3.3 Tratamentos	28
3.4 Testes laboratoriais	29
3.5 Análise Estatística	30
4. Resultados e Discussão	30
4.1 Hemograma	30
4.2. Bioquímica clínica	35
5. Conclusões	46
6. Referências bibliográficas	47
Anexo	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios seguidos do desvio padrão da contagem eritrócitos e determinação do volume globular e concentração de hemoglobina, de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR)	31
Tabela 2: Valores médios seguidos do desvio padrão da contagem de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR)	34
Tabela 3: Valores médios seguidos do desvio padrão da concentração de proteína total plasmática (g/dL) e albumina (g/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR) ..	36
Tabela 4: Valores médios seguidos do desvio padrão da concentração de colesterol (mg/dL) e triglicérides (mg/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR) ..	38
Tabela 5: Valores médios seguidos do desvio padrão da concentração de glicose (mg/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).....	39
Tabela 6: Valores médios seguidos do desvio padrão das atividades (U/L) de alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferases, fosfatase alcalina (ALP) e lactato desidrogenase (LDH) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).....	40
Tabela 7: Valores médios seguidos do desvio padrão das atividades de superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH Px) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR)	43
Tabela 8: Valores médios seguidos do desvio padrão das concentrações de ácido úrico, bilirrubina total, creatinina e uréia (mg/dL) de cães hípidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).....	44
Tabela 9: Valores médios seguidos do desvio padrão das concentrações de cálcio (mg/dL) e magnésio (mmol/L) de cães hípidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).....	46

LISTA DE FIGURAS

Fig.1: Gráfico do VG(%)de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2	32
Fig.2: Gráfico da contagem de eritrócitos($\times 10^6 \mu\text{L}$) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	32
Fig. 3: Gráfico da concentração de hemoglobina (g/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	33
Fig.4: Gráfico da contagem de leucócitos($\times 10^3$) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	34
Fig.5: Gráfico da concentração de albumina sérica (g/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	37
Fig.6: Gráfico da concentração de PTP (g/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	37
Fig.7: Gráfico da concentração de triglicérides séricos (mg/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	39
Fig.8: Gráfico da concentração de glicose (mg/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	40
Fig.9: Gráfico da concentração de AST (U/L) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	41
Fig.10: Gráfico da concentração de ALT (U/L) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	41
Fig.11: Gráfico da concentração de SOD (U/mL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	42
Fig.12: Gráfico da concentração de GSH Px (U/L) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	43
Fig.13: Gráfico da concentração de uréia (mg/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	45
Fig.14: Gráfico da concentração de creatinina (mg/dL) de cães hípidos submetidos a auto hemoterapia menor (AHm), auto hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), nos tempos 0, 1 e 2.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

μg : Micrograma	IL-8: Interleucina 8
μL : Microlitro	IL- β : Interleucina beta
μm : Micrometro	IR: Insuflação retal
$\mu\text{mol/L}$: Micromol por Litro	Kg: Quilo
O_2^- : Ânion superóxido	LAC : Laboratório de análises clínicas
A:G: Relação albumina/globulina	LDH: Lactato desidrogenase
ACD: Citrato ácido dextrose	LDL: Low Density Protein
AHm: Auto-hemoterapia menor	LPS: Lipopolissacarídeos
AHmO3: Auto-hemoterapia menor ozonizada	máx.: Máximo
Alb: Albumina	MCH: Hemoglobina corpuscular média
ALP: Fosfatase alcalina	mg/dL: miligrama por decilitro
ALT: Alanina aminotransferase	mg/L: Miligrama por litro
ANOVA: Análise de Variância	Mg: Magnésio
AST: Aspartato aminotransferase	mg: Miligrama
ATP: Trifosfato de adenosina	Mg ²⁺ :Magnésio
cal: Calorias	mín. : Mínimo
CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média	mL: Mililitro
Cu ⁺⁺ : Cobre	mmHg: Milímetro de mercúrio
ERNs: Espécies reativas nitrogênio	NF- κB :Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> <i>beta</i>
EROs: Espécies reativas de oxigênio	NO [*] : Óxido nítrico
EV-UFMG: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais	° C: Grau Celsius
Fe ²⁺ : Ferro	O ₃ :Ozônio
Fig.: Figura	OH [*] : Radical hidroxila
g/dL: Grama por decilitro	ORMD: Distúrbios metabólicos associados a obesidade
GSH: Glutaciona	pO ₂ : Pressão de oxigênio
GSH-Px: Glutaciona peroxidase	POLs: Produtos de oxidação lipídica
GSH-Rd :Glutaciona redutase	PTP: Proteína total plasmática
H ₂ O ₂ : Peróxido de hidrogênio	rpm: Rotações por minuto
Hb :Hemoglobina	SM: Síndrome metabólica
HDL: High Density Lipoprotein	SOD: Superóxido dismutase
IFN- α : Interferon alfa	Tab.: Tabela
IFN- β : Interferon beta	TNF: Fator de necrose tumoral
IFN- γ : Interferon gama	TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β : Interleucina 1 beta	u/L: Unidade por litro
IL-2: Interleucina 2	VCM: Volume celular médio
IL-6: Interleucina 6	VG: Volume globular

ANEXO

Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 61

RESUMO

A consequência da aplicação do O₃ medicinal é a formação de segundos mensageiros que provocam estresse oxidativo controlado, atuando sistemicamente na melhora da resposta antioxidante, imune e circulatória. Algumas das principais vias de administração da oxigênio-ozonioterapia são a auto-hemoterapia e a insuflação retal. Um total de 21 cães hípidos foi dividido em três grupos: auto-hemoterapia menor/AHm (n=5), auto-hemoterapia menor ozonizada/AHmO₃ (n=10) e insuflação retal/IR (n=6) - para cada grupo, foram mensurados e comparados os padrões hematológicos (eritro e leucograma), bioquímicos (albumina, proteínas totais, colesterol, triglicerídeos, glicose, transaminases (AST e ALT), fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, uréia, creatinina, bilirrubina total, ácido úrico, cálcio e magnésio) e enzimas antioxidantes (SOD e GSH-Px). Nos grupos AHmO₃ e IR ocorreram alteração dos parâmetros eritrocitários e redução das concentrações séricas de albumina, proteínas totais e triglicerídeos. No grupo AHmO₃ ocorreu, também redução da concentração de monócitos. O ozônio intra-retal altera mais parâmetros bioquímicos que a administração de sangue autólogo ozonizado. Aplicações de ozônio retal ou intramuscular - associado ou não a sangue autólogo - causam aumento da GSH-Px em cães hípidos. A administração de sangue autólogo via intramuscular, bem como sangue ozonizado não causam efeitos colaterais adversos em cães.

Palavras- chave: antioxidantes, auto-hemoterapia, hematologia, O₃.

ABSTRACT

The expected effect of medical O₃ is the formation of second messengers that trigger a controlled oxidative stress, acting systemically to improve the antioxidant, immune, and circulatory responses. Some of the main administration routes of oxygen-ozone therapy are autohemotherapy and rectal insufflation. One sample from 21 healthy dogs was divided into three groups: minor autohemotherapy/AHm (n=5), minor ozonated autohemotherapy/AHmO₃ (n=10) and rectal ozone insufflation/RI (n=6). For each group, hematological, clinical biochemistry (albumin, total proteins, cholesterol, triglycerides, glucose, transaminases (AST and ALT), alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, urea nitrogen, creatinine, total bilirubin, uric acid, calcium and magnesium) and antioxidant enzymes (GSH-Px and SOD) assays were performed and the results were compared. AHmO₃ and RI groups presented changes in hematological parameters and reduction in serum albumin, total proteins and tryglicerides. The AHmO₃ group also showed lower concentration of monocytes. The rectal administration of ozone changes more biochemical parameters than ozone-enriched autologous blood application. Autohemotherapy - with or without ozone - and rectal ozone insufflation increase the GSH-Px level. Administration of autologous blood with or without ozone by intramuscular route causes no adverse side effects in healthy dogs.

Key words: antioxidants, autohemotherapy, hematology, O₃.

1. Introdução

Os primeiros relatos da oxigênio-ozonioterapia datam do início do século passado, quando esse gás foi usado de forma empírica no tratamento de feridas gangrenadas de soldados durante a Primeira Guerra Mundial (Bocci, 1996a; Bocci, 2006). No Brasil, a técnica vem sendo utilizada e difundida desde meados da década de 70, principalmente em alterações circulatórias de humanos. Na Medicina Veterinária seu uso é mais recente, mas é uma técnica que vem ganhando novos adeptos e gerado novas pesquisas (ABOZ, 2013).

Dentre situações em que o ozônio (O₃) é indicado terapeuticamente encontram-se: doenças isquêmicas avançadas, osteoartrose, osteomielite, abscessos com fístula, feridas infectadas, úlceras de decúbito, úlceras crônicas, queimaduras, fibromialgia, infecções crônicas da cavidade oral, doenças infecciosas agudas e crônicas, hérnia de disco intervertebral, doenças neurodegenerativas, tumores, giardíase e alergias (ISCO3, 2010; Bocci et al., 2011).

Duas das principais vias de administração da oxigênio-ozonioterapia são a auto-hemoterapia maior e menor ozonizadas, que consiste na ozonização extra corpórea do sangue e posterior aplicação pelas vias intramuscular ou endovenosa (Hensler et al., 2009; Viebahn-Hänsler et al., 2012). Outra via bastante utilizada, por ser de fácil manejo, de baixo custo e gerar bons resultados, é a insuflação retal (IR). Segundo Rodekohl e Kübler (2009), a aplicação de O₃ por via retal pode ter os mesmos efeitos que aplicações sistêmicas.

A ação esperada do O₃ medicinal, quando administrado por essas vias, é a formação de segundos mensageiros que provocam estresse oxidativo controlado, atuando sistemicamente na melhora da resposta antioxidante, imune e circulatória (Viebahn-Hänsler et al., 2012).

Elucidar as formas de como a oxigênio-ozonioterapia funciona e como atua *in vivo* justifica a realização do presente trabalho, no qual foi comparado o efeito da auto-hemoterapia (AHm) e de duas técnicas de aplicação do O₃ medicinal, em cães saudáveis: auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO₃) e IR, utilizando como variáveis o perfil hematológico, bioquímico e as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px).

2. Revisão de literatura

2.1 Estresse oxidativo

Apesar da necessidade de oxigênio (O₂) para sobreviver, os tecidos biológicos de organismos aeróbicos, se expostos a altas doses desse gás, sofrem danos. A causa é atribuída às espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) que inativam enzimas antioxidantes diretamente ou as exaurem e levam a lesões celulares. Segundo Gutteridge e Halliwell (1996) as principais espécies reativas são o ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxila (OH[•]) e o óxido nítrico (NO[•]).

As EROs podem ser de origem endógena ou exógena. As principais fontes endógenas provêm de doenças em geral, da ação de enzimas como a cicloxigenase e lipoxigenase e de células como fagócitos e outros leucócitos, todos gerados no processo inflamatório como resposta inespecífica e extremamente comum a diversas enfermidades. As fontes exógenas são

principalmente produtos químicos como praguicidas, poluentes e ácidos graxos poli-insaturados (Monteiro, 2006).

As reações promovidas pelos radicais livres com biomoléculas podem causar danos, muitas vezes irreversíveis, sendo que o mais grave é o que ocorre no material genético. Após a quebra do DNA pode haver rearranjo das bases e consequente mutação, o que poderá desencadear um processo oncogênico (Halliwell e Aruoma, 1991; Barreiros e David, 2006). Podem ocorrer, também, alterações nas atividades enzimáticas e no transporte através de membrana, provocando morte celular. No sangue, a oxidação de lipídios desencadeia processo inflamatório nas paredes de vasos (artérias e veias), induzindo o acúmulo desses lipídios e formação de placas ateroscleróticas (Barreiros e David, 2006).

O $\cdot\text{O}_2$ é formado *in vivo* por diferentes vias. A principal delas é a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias e quanto maior a concentração de O_2 , maior será a produção desse ânion. Outra via ocorre em alguns leucócitos ativados (monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos) e é um importante mecanismo de inativação de microrganismos. O H_2O_2 é formado pela reação catalisada pela SOD, atravessa rapidamente a membrana celular e atua como agente oxidante (Gutteridge e Halliwell, 1996). Apesar do potencial lesivo, ao reagir com metais e produzir $\text{OH}\cdot$, essa molécula é inativada por catalases e peroxidases como a GSH-Px (Barreiros e David, 2006). Os $\text{OH}\cdot$ reagem, mesmo em pequenas concentrações, com todas as moléculas encontradas *in vivo*. São formados no organismo a partir da reação de H_2O_2 com metais de transição (principalmente Cu^{++} e Fe^{2+}) e homólise de água por exposição à radiação ionizante. Os $\text{OH}\cdot$ são os principais responsáveis por quebrar DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocôndrias (Gutteridge e Halliwell, 1996). Além disso, ao reagirem com aminoácidos de enzimas, podem levar a perda de atividade enzimática, prejudicar o transporte ativo através de membranas, e levar a morte celular (Barreiros e David, 2006). O $\text{NO}\cdot$ é liberado principalmente pelas células do endotélio vascular e por fagócitos. É uma importante molécula efetora contra microrganismos em macrófagos e apresenta função citotóxica em células tumorais (Jorens et al., 1995). Tem potente efeito vasodilatador e, em conjunto com o $\cdot\text{O}_2$, é responsável pelo controle do tônus de vasos que possuem camada muscular. Apesar de efeitos fisiológicos importantes, se produzido em excesso, leva a dano e morte celulares (Gutteridge e Halliwell, 1996).

2.2 Peroxidação lipídica

O $\cdot\text{O}_2$ é um metabólito com importantes papéis na sinalização de processos de divisão celular, quando produzido em quantidades corretas. Entretanto, ao ser produzido em grandes quantidades, pode iniciar a peroxidação lipídica, oxidação protéica e causar danos ao DNA, o que leva à disfunção celular, morte por apoptose ou necrose (McCord e Edeas, 2005).

A peroxidação lipídica é definida como a deterioração de lipídeos que contém duas ou mais ligações duplas de carbono. O principal alvo das EROs na peroxidação são os ácidos graxos poli-insaturados das membranas lipídicas e os principais produtos da peroxidação (POLs) são o malondialdeído e os hidroperóxidos. Os níveis desses produtos são utilizados como marcadores de danos celulares causados por radicais livres (Beevi et al., 2004; Hummel et al., 2006; Walter et al., 2006).

2.3 O gás ozônio

A molécula de O₃ é composta por três átomos de oxigênio em uma estrutura cíclica e é encontrada na forma de gás. A formação de O₃ medicinal ocorre a partir da passagem de O₂ puro por um gerador. Esse O₂ recebe uma descarga de alta voltagem de acordo com a reação: $3 \text{O}_2 + 68,400 \text{ cal} \rightarrow 2 \text{O}_3$

O O₃ é 10 vezes mais solúvel em água que o O₂, é o terceiro oxidante mais potente depois do flúor e do persulfato. É uma molécula muito instável, com meia-vida de 40 minutos à 20°C (Bocci, 2004a) e um gás controverso, pois, ao mesmo tempo em que está presente na estratosfera, bloqueando as radiações ultravioletas e protegendo os organismos vivos dessas radiações, é tóxico se inalado cronicamente e/ou em altas concentrações (Bocci et al., 2011).

2.4 Vias de administração do ozônio medicinal

As vias para o uso do O₃ medicinal são variadas. Aplicações locais são utilizadas na odontologia, em cáries e infecções da raiz dentária (Almaz e Sonmez, 2013; Halbauer et al., 2013, Shilpa Reddy et al., 2013) e em feridas infeccionadas (Shah et al., 2011). Um método de ozonização extracorpórea é a auto-hemoterapia maior e menor, na qual o sangue é misturado ao O₃ e novamente injetado no paciente (Hensler et al., 2009; Foglieni et al., 2011; Borrelli et al., 2012; Viebahn-Hänsler et al., 2012). Outras vias utilizadas em humanos são, retal (Leon et al., 1998; Barber et al., 1999; Al-Dalai et al., 2001; Leon Fernandez et al., 2008; Fernández Iglesias et al., 2011), intraperitoneal (Schulz et al., 2003; Zamora et al., 2005; Madej et al., 2007; Guven et al., 2008; Guven et al., 2009; Aslan et al., 2012; Gul et al., 2012; Uysal et al., 2012; Bakkal et al., 2013), intrarticular (Vaillant et al., 2013) e intramuscular (Lin et al., 2011).

A IR de O₃ foi descrita pela primeira vez por Aubourg (1940) (citado por Bocci et al., 2012) para tratamento de colite crônica e fístulas. A partir de então, essa técnica começou a ser amplamente utilizada por ser de fácil aplicação e baixo custo.

Calunga e colaboradores (2009) demonstraram que a aplicação de O₃ por via retal em ratos preveniu danos causados por isquemia renal e melhorou a resposta antioxidante desses animais. Outro trabalho com animais aos quais foi administrado propanolol, demonstrou aumento de oxigenação do sangue na veia porta e melhor resposta hepática após administração de O₃ por essa via (Zaky et al., 2011). Martínez-Sánchez et al. (2005) demonstraram que, em humanos com diabetes tipo II, o O₃ intra-retal melhorou o índice glicêmico, diminuiu a resistência periférica à insulina e preveniu o estresse oxidativo associado à doença. Na prática clínica, Metz (2010) relatou melhora no caso de um cão Basset de onze anos acometido por uma hérnia de disco e, após tratamentos com as terapias convencionais, que não surtiram o efeito desejado, passou por aplicação retal de O₃, demonstrando o efeito anti-inflamatório sistêmico do O₃ por via retal.

Por outro lado, Bocci e colaboradores (2012) questionaram a eficácia e segurança da IR de O₃. Segundo esses autores, a IR é muito utilizada pois apresenta baixo custo, mas a padronização da técnica é difícil de ser determinada. Alguns fatores como quantidade de material fecal no reto e a ocorrência de flatulência durante a aplicação invalida a técnica pois não é possível garantir que a dose aplicada seja realmente absorvida. Argumentam, ainda, que mesmo com empecilhos, caso ocorra algum resíduo de O₃, esse será neutralizado pelo glicocálix e mucoproteínas da membrana das células da mucosa. Assim, apenas pequena quantidade de segundos mensageiros

do O_3 como POLs será absorvida e todo o H_2O_2 será reduzido, o que não promove a ação esperada da oxigênio-ozonioterapia.

Na Medicina, relatos sobre a aplicação da auto-hemoterapia em casos de pneumonia, furunculose, bronquite, eczemas e urticárias são descritos desde o final do século XIX (Mettenleiter, 1936). Alguns estudos em humanos demonstraram resultados positivos do tratamento com sangue autólogo em doenças como herpes-zóster (Olwin et al., 1997) e refluxo vesico-ureteral em crianças (Paradysz et al., 1998). Por outro lado, Schirmer e colaboradores (2000) não encontraram diferenças significativas em resultados de pacientes com espondilite anquilosante, enquanto Hensler e colaboradores (2009), não observaram resultados positivos da auto-hemoterapia em pacientes com gripe. A auto-hemoterapia maior ozonizada, foi descrita pela primeira vez em 1974 por Wollf e consiste na retirada de sangue periférico em recipiente com anticoagulante, sua ozonização e reinfusão endovenosa (Bocci, 2006). Já a auto-hemoterapia menor ozonizada é o procedimento no qual é retirada pequena quantidade de sangue que é misturada ao O_3 e reinfundida por via intramuscular (Viebahn-Hänsler et al., 2012). Em animais de laboratório, Foglieni et al. (2011) demonstraram resposta positiva após isquemia renal. Na Medicina Veterinária, foi demonstrada a eficácia da auto-hemoterapia em pontos de acupuntura como agente analgésico e anti-inflamatório no pós operatório de castração de cavalos (Escodro et al., 2012), em bovinos com papilomatose (Da Silva et al., 1998) e em cães com tumor venéreo transmissível (Drumond et al., 2013).

2.5 Resposta antioxidante e ação sistêmica do ozônio

Para se proteger das EROs e ERNs, o organismo produz enzimas e possui micromoléculas endógenas e exógenas que têm efeito antioxidante. Os três sistemas enzimáticos antioxidantes conhecidos são: enzimas SOD, que catalisam a destruição do $\cdot O_2$, convertendo-o em O_2 e H_2O_2 ; sistema formado pela catalase (CAT), que atua na dismutação do H_2O_2 em O_2 e água, e pela glutatona (GSH) em conjunto com duas enzimas, GSH-Px e glutatona redutase GSH-Rd. Esse conjunto também catalisa a dismutação do H_2O_2 em O_2 e água e são a primeira linha de defesa celular contra a ação tóxica de radicais livres (Barreiros e David, 2006; Gizzi et al., 2011). Dentre as micromoléculas com efeito antioxidante estão os carotenóides, bilirrubina, ubiquinona, albumina, ácido úrico e compostos lipofílicos. Outras mais importantes são os tocoferóis (vitamina E) e o ácido ascórbico ou vitamina C (Barreiros e David, 2006).

No sangue, os eritrócitos possuem reservas de GSH, tioredoxina, CAT, GSH-Px, GSH-Rd e SOD. Todo esse sistema antioxidante age em conjunto para acelerar a redução de oxidantes nocivos (Bocci et al., 2011).

Após cinco minutos, em uma mistura de sangue com O_3 e O_2 , os valores da pressão de oxigênio (pO_2) sobem de 40mmHg até 500mmHg e permanecem estáveis. Devido a suas características físico-químicas, assim que entra em contato com fluídos corporais, o O_3 reage com ácidos graxos poli-insaturados e substâncias antioxidantes. Dependendo da dose, carboidratos, enzimas, DNA e RNA também podem ser afetados. Ao reagir com esses compostos, EROs e os POLs são formados. Ambos agem como mensageiros do O_3 e são os responsáveis pelos efeitos terapêuticos e biológicos. As EROs agem imediatamente após sua formação e os POLs são distribuídos via circulação sanguínea, agindo como mensageiros de longa duração (Bocci, 2004b; Bocci et al., 2011). Podem provocar danos ao organismo, mas agem como reguladores e representam um importante mediador da resposta imune e antioxidante do paciente. Por isso, o objetivo da oxigênio-ozonioterapia é provocar estresse oxidativo transitório e controlado para que a produção dos mensageiros do O_3 causem, apenas benefícios (Hernández, 2007).

As EROs são o ânion $\cdot O_2$, peróxido de hidrogênio H_2O_2 , o $\cdot OH$, o oxigênio singlete (1O_2)(Bocci, 1996a). O H_2O_2 é uma das EROs mais importantes. Ele se difunde do plasma para

diferentes células onde participa de vias bioquímicas, o que resultará em efeitos biológicos tardios como, por exemplo, o estímulo da produção de SOD, GSH-Px, GSH-Rd e CAT (León et al., 1998; Bocci, 2004a; Bocci et al., 2011).

O O₃ aumenta a taxa de glicólise do eritrócito e abaixa o pH sanguíneo. Isso estimula o aumento da concentração do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) que é responsável pelo enfraquecimento da ligação entre o O₂ e a hemoglobina (Hb), permitindo que o O₂ seja liberado sob menor pressão. Assim, ocorre melhor oxigenação em tecidos isquêmicos (Bateman et al., 2003; Bocci et al., 2011).

A ação do O₃ está associada à elevação da proteção antioxidante em doenças que levam a esse desequilíbrio como septicemia (Schulz et al., 2003; Madej et al., 2007), cistite (Tasdemir et al., 2013), artrite reumatóide (Vaillant et al., 2013), diabetes (Al-Dalain et al., 2001), enterocolite necrosante (Güven et al., 2009), alterações renais (Barber et al., 1999), hepáticas (Leon Fernandez et al., 2008; Gul et al., 2012), pulmonares (Leon et al., 1998; Bakkal et al., 2013) e queimaduras esofágicas (Güven et al., 2008). Além de lesões de reperfusão nos rins (Fernández Iglesias et al., 2011), ovários (Uysal et al., 2012) e fígado (Aslan et al., 2012). Sua atividade é demonstrada nos órgãos alvo através da elevação da SOD (Leon et al., 1998; Barber et al., 1999; Güven et al., 2008; Gul et al., 2012; Uysal et al., 2012; Bakkal et al., 2013; Tasdemir et al., 2013), CAT (Zamora et al., 2005) e GSH-Px (Güven et al., 2008; Gul et al., 2012; Uysal et al., 2012; Tasdemir et al., 2013).

Após algumas aplicações de O₃ pode ocorrer tolerância ao O₃. Doses sub-micromolares de POLs presentes no sangue ozonizado atingem a medula óssea e podem estimular a produção de enzimas antioxidantes no local e até mesmo melhorar o sistema antioxidante de eritrócitos que serão formados (León et al., 1998; Bocci, 2004b; Bocci et al., 2011).

2.6 O ozônio como imunomodulador

Apesar dos efeitos bactericida, fungicida e viricida, o O₃ e seus mensageiros, não são capazes de atingir microrganismos *in vivo*, pois, a dose indicada para uso sistêmico não é suficiente para atingi-los sem causar dano tecidual e estresse oxidativo exacerbado (Bocci, 2004b). Entretanto, além do estímulo antioxidante, o O₃ também estimula a resposta imune (Sagai e Bocci, 2011). Por esse motivo, estudos foram realizados para avaliar as aplicações sistêmicas de O₃ e suas implicações na resposta imune de humanos e animais. Foi demonstrado que a exposição ao O₃ pode, tanto suprimir quanto estimular a resposta imune (Jakab et al., 1995; Bocci, 1996b; van Hoof et al., 1997; Bocci et al., 1998; Valacchi e Bocci, 2000; Zamora et al., 2005, Bocci, 2004a; Bocci et al. 2005). Essas diferenças entre resultados ocorrem por diferentes motivos que vão desde as espécies animais usadas nos experimentos, doses, vias de administração e até os desenhos experimentais usados (Jakab et al., 1995; Bocci, 2004a). As dosagens são as variáveis com maior importância para essas diferenças e foi demonstrado que baixas doses de O₃ são capazes de induzir a resposta imune enquanto altas doses a inibem (Bocci, 1996b).

Fujimaki et al., (1984) constataram que o O₃, quando inalado, diminui a expressão de anticorpos e as funções de linfócitos T no baço e timo de camundongos BALB/c, gerando um efeito imunossupressor. Esses resultados ajudaram a comprovar que o O₃ é tóxico para o epitélio respiratório e que esse gás não deve ser administrado pela via inalatória. Hoje, de acordo com as recomendações do Comitê Científico Internacional de Ozonioterapia (ISCO3), a via inalatória é a única totalmente proibida e, além disso, existem regras de segurança para a aplicação por outras vias a fim de se evitar inalação de qualquer quantidade de O₃ em qualquer concentração (ISCO3, 2010). A influência do O₃ sobre o sistema imune já foi documentada após

o uso por IR (Guven et al., 2009) e por via intraperitoneal (Schulz et al., 2003; Bakkal et al., 2013).

Os mensageiros do O₃, em particular o H₂O₂, agem no citoplasma de células mononucleares do sistema imune ativando o NF-κB que é responsável pela transcrição de genes responsáveis pela produção de citocinas (Bocci e Paulesu, 1990; Valacchi e Bocci, 2000; Bocci, 2004a). As citocinas são proteínas que estimulam receptores celulares e são responsáveis por mediar e regular vários aspectos, tanto da resposta imune inata e adaptativa, quanto da hematopoese. São liberadas em pequenas doses e podem atuar em vários tipos celulares, ter ações redundantes, sinérgicas, antagonistas ou induzir cascatas (Kindt et al., 2007; Abbas et al., 2011). Podem estimular a proliferação e ativação de células imunocompetentes, produção de imunoglobulinas, leucotrienos e prostaglandinas (Seidler et al., 2008).

Em infecções graves, o fator de necrose tumoral (TNF) é produzido em grandes quantidades e induz efeitos sistêmicos maléficos como redução da pressão arterial, trombose intravascular, catabolismo de tecido muscular e adiposo. No choque séptico, provocado por lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas ou pelo ácido lipoteicoico de bactérias gram-positivas, ocorre colapso vascular, coagulação intravascular disseminada e alterações metabólicas. Todas essas complicações acontecem por aumento da produção de TNF e outras citocinas (Abbas et al., 2011). Zamora et al. (2005) demonstraram que, após a administração de LPS intraperitoneal em camundongos, ocorreu diminuição da liberação de TNF-α em animais que foram adaptados ao estresse oxidativo com O₃ nos cinco dias anteriores a inoculação do antígeno, diminuindo assim os efeitos do choque séptico. Outros autores demonstraram os mesmos efeitos nos tecidos alvo (Leon Fernandez et al., 2008; Vaillant et al., 2013) e no líquido peritoneal (Uysal et al., 2012). Houve também uma diminuição na concentração da interleucina-1β (IL-1β) no soro de animais tratados com insuflação peritoneal de O₃ (Bakkal et al., 2013).

Se, por um lado, o O₃ pode inibir a produção exagerada de TNF-α, por outro pode estimular a produção de outras citocinas que estão relacionadas à sinalização entre células do sistema imune. Bocci e colaboradores em 2005 demonstraram que o tratamento com O₃ pode induzir a liberação dessas citocinas que agirão de forma benéfica. As citocinas identificadas foram alguns interferons (IFN-α, IFN-β e IFN-γ) e interleucinas (IL-2, IL-6 e IL-8).

Estudos *in vitro* realizados por Bocci et al., (1998) e Valacchi e Bocci (2000) demonstraram que após a exposição de sangue humano ao O₃ houve aumento significativo na liberação de Interleucina 8 (IL-8), uma citocina quimiotática que atrai leucócitos para o foco da inflamação. Eles então concluíram que esse resultado indicaria a possibilidade do uso do O₃ como adjuvante no tratamento de doenças virais crônicas em pacientes imunossuprimidos. Bocci (1996b) sugeriu que a aplicação de auto-hemoterapia ozonizada em pacientes na fase inicial da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana pode evitar a falência do sistema imune, o que é frequentemente observado nesses pacientes devido à alta liberação de algumas citocinas.

2.7 Toxicidade do ozônio e contraindicações da oxigênio-ozonioterapia

A dosagem para aplicação do O₃ respeita, na maioria das vezes, o conceito de hormese, que é utilizado para agentes que provocam o efeito benéfico quando o organismo é submetido à baixas doses e, ao mesmo tempo, se administrado em doses mais altas provoca efeito inibitório (Goldman, 1996). Esse conceito no caso do O₃ não é totalmente aplicável, pois em alguns casos o uso de doses mais elevadas pode levar a uma resposta satisfatória, mas com efeitos colaterais (Bocci et al., 2011).

Ao lado dos efeitos terapêuticos desejados, o O₃ é conhecido por seus efeitos tóxicos aos pulmões (Mudway e Kelly, 2000; Al-Hegelan et al., 2011). A esses efeitos estão associados o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL- β e IL-6 (Li et al., 2011) e o recrutamento de células como neutrófilos e macrófagos alveolares ao tecido pulmonar (Li et al., 2013). Devido a esses processos inflamatórios, o O₃ é associado a diferentes doenças, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (Khatri et al., 2009; Halonen et al., 2010).

Bocci (2005) contraindica a oxigênio-ozonioterapia no terço inicial da gestação e, em casos de hipertireoidismo ou diabetes não controlados. Outras desordens celulares que contraindicam o tratamento com ozônio são a trombocitopenia e a anemia severa, especialmente em pacientes que apresentem deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. O mesmo autor ainda menciona a contraindicação para pacientes tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina.

2.8 Hematologia

Os componentes celulares do sangue podem refletir, precocemente, alterações sistêmicas, ou mesmo respostas locais do organismo (Kaneko et al., 2000), dessa forma o hemograma é indiscutível na prática médica, tanto para o diagnóstico quanto acompanhamento clínico de uma enfermidade (Jain, 1993). Sua fácil e rápida realização o tornam um dos exames mais frequentemente realizados no laboratório clínico, sendo considerado um exame de primeira linha (Stockham e Scott, 2008). O hemograma consiste na determinação das concentrações das séries eritrocitária, leucocitária e plaquetária do sangue, na avaliação da morfologia dessas células e na mensuração da proteína total plasmática (PTP). É uma ferramenta utilizada como apoio para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de diversas enfermidades (Barger, 2003; Bossa-Miranda, 2012).

A contagem das hemácias, o volume globular (VG), a concentração de Hb, o volume celular médio (VCM), a concentração de Hb corpuscular média (CHCM), valores da Hb corpuscular média (HCM) e PTP compõem o eritrograma. O esfregaço sanguíneo proporciona informações adicionais sobre a morfologia das hemácias. O volume celular médio (VCM) indica a média de tamanho das hemácias e, com os valores da concentração de Hb corpuscular média (CHCM) e da Hb corpuscular média (HCM), é utilizado para a classificação morfológica das anemias. A destruição das hemácias leva a um aumento dos valores de CHCM e/ou HCM e também diminuição do VG, possibilitando a avaliação da ocorrência de hemólise *in vivo* ou *in vitro* (Barger, 2003).

A interpretação do leucograma inclui a contagem total e diferencial de leucócitos. Monócitos, basófilos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos segmentados ou bastonetes podem ser observados em esfregaços, entre outras células nucleadas, além da morfologia dessas células. Também é parte fundamental da prática clínica, pois fornece informações importantes sobre processos

patológicos diversos (Jain, 1993). O aumento do número de leucócitos é denominado leucocitose, enquanto que a diminuição é denominada leucopenia. A contagem diferencial auxilia na determinação das causas de leucocitose ou leucopenia, indicando ocorrência de processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos, além de estresse, excitação e hipersensibilidade (Barger, 2003).

2.9. Perfil bioquímico

O perfil bioquímico sérico de cães é utilizado na avaliação clínica laboratorial e oferece informações importantes sobre o estado geral do animal, diagnóstico e prognóstico quando analisado com o histórico, outros exames laboratoriais e clínicos do animal (González et al., 2001). Alguns analitos informam alterações ocorridas após tratamentos e são de grande valia na pesquisa. Dentre os analitos que compõem o perfil bioquímico de rotina, na maioria dos laboratórios, encontram-se: glicose, colesterol, PTP, albumina, globulinas, uréia, bilirrubina, creatinina, fosfatase alcalina (ALP), aspartato (AST) e alanina aminotransferase (ALT), creatina quinase (CK), cálcio, fósforo e magnésio (González et al., 2001).

2.9.1 Enzimas séricas e antioxidantes

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima importante no metabolismo de aminoácidos e na gliconeogênese. É encontrada principalmente no fígado, mas também tem atividade nos rins, coração, músculo, pâncreas, gordura e cérebro (Center, 2007; Miyazaki, 2009) e tem meia vida de 60 horas (Dial, 1995). No fígado, sua concentração é mais elevada nos hepatócitos periportais (Center, 2007).

A ALT possui duas isoenzimas (ALT-1 e 2). A ALT-1 está presente principalmente no fígado, mas também é encontrada no músculo esquelético. A ALT2 é encontrada primariamente no músculo esquelético (Miyazaki, 2009). O aumento da ALT no soro pode sugerir lesão hepática, mas não deve ser utilizada como único indicador dessa lesão, pois outros parâmetros bioquímicos são necessários para a determinação de injúria celular significativa (Hosoya et al., 2009). A AST é uma enzima predominantemente hepática, com meia vida de 12 horas (Dial, 1995), mas, assim como a ALT também está presente em outros órgãos como rins, coração, músculo esquelético, cérebro, intestino delgado, baço, além das hemácias. No fígado, concentra-se principalmente em hepatócitos da região periacinar. Nas células, as isoenzimas da AST estão presentes no citosol e mitocôndrias e estão relacionadas à degradação e biossíntese de aminoácidos (Center, 2007).

Apesar da mensuração dessa enzima ser mais utilizada para avaliar o perfil hepático, sua elevação também indica hemólise, uma vez que uma isoenzima está presente nas células vermelhas do sangue (Nsiah et al., 2011; Elrouf et al., 2013).

O grupo da ALP possui inúmeras isoenzimas distribuídas em vários tecidos do organismo como, por exemplo, no fígado, intestino, rins, glândulas mamárias, ossos e placenta (Fukui et al., 2003; Fernandez e Kidney, 2007). Em doenças hepáticas, a ALP é um marcador bioquímico importante utilizado para diagnóstico de doenças colestáticas, mas por existirem isoenzimas distribuídas em diversos tecidos, o aumento de sua atividade no soro pode estar relacionado a outros fatores tais como, gestação, lactação, dietas ricas em gordura, alterações ósseas ou endócrinas e neoplasias. Animais jovens apresentam valores mais elevados (Sanecki et al., 1993; Syakalima et al., 1997; Fernandez, 2007), assim como aqueles que recebem terapia anticonvulsivante ou com glicocorticóides (Fernandez, 2007).

A LDH é uma enzima presente no citosol das células que catalisa a reação reversível entre piruvato e lactato na via glicolítica (Walter et al., 2007). Cada tecido tem sua isoenzima característica, que também varia entre as espécies animais (Washizu et al., 2002; Arai et al., 2003). Sua maior atividade é no músculo esquelético, seguido pelo cardíaco, rins, mucosa do intestino delgado, pulmões, pâncreas e ossos. No soro sanguíneo, aparentemente, a maior fonte de LDH é hepática. Níveis elevados de LDH no soro são vistos em animais com necrose ou inflamação hepáticas, miosite ou trauma muscular e linfossarcoma (Milne et al., 1987; Center, 2007). A LDH também tem sido utilizada como marcador de hemólise intravascular associada a outros analitos como AST e bilirrubina (Tabbara, 1992; Kato et al., 2006).

A GSH-Px é uma proteína de 80kDa composta por quatro subunidades idênticas. Em mamíferos, existem cinco isoformas bem definidas dessa enzima (Leonel et al., 2014). Sua função antioxidante se baseia em reduzir H₂O₂ e outros hidroperóxidos a água e álcool, respectivamente (Gizi et al., 2011).

No citoplasma das hemácias, a GSH-Px e a CAT reagem com o H₂O₂, mas somente a GSH-Px atua nos POLs (Horton e Fairhurst, 1987; Nagababu et al., 2003). Em casos de deficiência de selênio ou estresse oxidativo exacerbado como o que ocorre em anemias, diabetes, doenças inflamatórias, neurodegenerativas, lesões de reperfusão ou neoplasias, ocorre uma redução dos níveis de GSH-Px (Townsend, 2003; McCord e Edeas, 2005).

A SOD faz parte de uma família de enzimas que catalisam a dismutação do O₂^{•-} a H₂O₂ e O₂. Atua com o sistema GSH-Rd:GSH-Px na proteção celular contra o O₂ e suas espécies reativas (McCord e Edeas, 2005; Omobowale, 2014). O O₂^{•-} e a ação da SOD tem relação com vários processos patológicos que envolvem o estresse oxidativo, como doenças inflamatórias (Babior et al., 1973; Salin e McCord, 1975), lesões de isquemia/reperfusão (Cerchiari et al., 1987), doenças degenerativas (Reiter, 1995), diabetes (Maritim e Sanders, 2003), câncer (Church et al., 2003) entre outras. A ação da SOD nesses casos é de grande importância mas, em condições nas quais o catabolismo do H₂O₂ está comprometido, pode elevar o estresse oxidativo por gerar mais peróxido que não será catabolizado (Scott et al., 1989).

2.9.2 Metabólitos

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas em humanos e primatas e, em cães, é metabolizado a alantoína através de sua descarboxilação pela enzima uricase. A alantoína é então excretada pelos rins (Kruger e Osborne, 1986; Strazzullo e Puig, 2007; Hill et al., 2011). Existem algumas evidências de que o ácido úrico tenha propriedades antioxidantes, agindo contra radicais livres no sangue (Glantzounis et al., 2005). Estudos em humanos demonstraram que a administração endovenosa de ácido úrico em indivíduos saudáveis diminuiu a concentração de radicais livres no soro (Waring et al., 2001) e reduziu o estresse oxidativo em

atletas submetidos ao exercício físico agudo (Hellsten et al., 2001; Chevion et al., 2003; Waring et al., 2003).

Apesar dos cães apresentarem concentrações (6-120 μ mol/L) muito abaixo daquelas vistas em humanos devido à conversão para alantóina, o ácido úrico é utilizado como marcador da capacidade antioxidante nesses animais, e só se encontra elevado em distúrbios hepáticos e insuficiência renal (Felice et al., 1990; Bartger, 2004; Stowe et al., 2006; Hesta et al., 2009) e mesmo assim não é utilizado nas avaliações de função hepática pois, apresenta baixas sensibilidade e especificidade (Hill et al., 2011).

Na rotina clínica o aumento da bilirrubina total sérica pode indicar lesão hepatocelular (Dial, 1995), hemólise ou obstrução de ductos hepáticos. Em casos de hemólise, a hiperbilirrubinemia é chamada de pré-hepática e se ocorre obstrução de ductos, é tida como pós-hepática. Quando ocorrem doenças hepáticas devido à diminuição da conjugação da bilirrubina livre e/ou retirada dessa da corrente sanguínea, é conhecida como hepática (Rothuizen et al., 1992, Kundur et al., 2015).

Em cães com hepatite crônica idiopática, o aumento da bilirrubina total indica prognóstico negativo, assim como em humanos (Gómez-Selgas et al., 2014). Já foi demonstrado que a bilirrubina tem ações antioxidante, anti-mutagênica, imunomoduladora, inibidora de plaquetas e, possivelmente, atua na redução de lipídeos séricos (Neuzil e Stocker, 1994; Jangi et al., 2013; Kundur et al., 2015).

A ureia é formada no fígado a partir da amônia que, normalmente, é proveniente do catabolismo protéico. Assim, a ingestão e o catabolismo de proteínas e aminoácidos influenciam diretamente nas concentrações séricas de ureia. Em humanos, algumas das causas do aumento da ureia são: hemorragia intestinal, febre, queimaduras, infecções, inanição, administração de corticóides e tetraciclina. Alguns elementos responsáveis pela diminuição desse analito são a menor ingestão de proteínas, uso de esteróides anabolizantes e insuficiência hepática. Na insuficiência renal aguda, o equilíbrio ácido-base influencia na concentração de ureia. Animais com pH sanguíneo mais próximo do básico apresentam concentrações mais baixas de ureia.

A ureia é predominantemente excretada pelos rins, mas existe alguma excreção intestinal que é mínima pois, o produto da degradação da ureia pelas bactérias intestinais é reabsorvido e levado ao fígado, onde é re-sintetizado (Kaneko et al., 2000).

A creatinina é produzida através do metabolismo da creatina e fosfocreatina provenientes do músculo esquelético e da alimentação, sendo excretada pela filtração glomerular (Braun et al., 2013; Lopes et al., 2014).

A análise laboratorial da concentração da creatinina sérica é utilizada para avaliar a função renal indiretamente, mas sozinha, não fornece informações precisas sobre o funcionamento dos rins em lesões agudas e não auxilia na localização da lesão no glomérulo (Braun et al., 2013; Pressler, 2013). Segundo Finco e colaboradores (1995), as concentrações de creatinina só aumentam quando a taxa de filtração glomerular está com apenas 30% de sua capacidade normal e por isso, ao fazer a interpretação dos resultados, é necessária a análise de outras variáveis.

2.9.3 Minerais

A concentração de cálcio sérico tem associação direta com o metabolismo mineral do indivíduo. No sangue mede-se o cálcio total, ou seja, a forma ionizada (livre) somada à forma não ionizada (associada com proteínas, principalmente albumina e também com ácidos orgânicos). Ambas se encontram em equilíbrio e sua distribuição depende do pH, da concentração de albumina e da relação ácido-base. A concentração de cálcio no sangue é regulada por um forte controle endócrino desempenhado pelo paratormônio (PTH). Uma das causas de diminuição da absorção do cálcio no intestino é a quantidade de proteína na dieta, ou seja, dietas hipoproteicas causam diminuição da absorção de cálcio (González, 2000). Por causa do controle endócrino os níveis séricos de cálcio variam pouco e se mantêm em equilíbrio com o fósforo. O PTH ao agir nos rins promove reabsorção de cálcio e redução na reabsorção de fósforo. Nos ossos, estimula a reabsorção de cálcio e redução na reabsorção de fósforo. A ALP também parece ser um grande regulador deste elemento (Anderson et al., 2004).

Depois do potássio, o Mg^{2+} é o segundo cátion mais abundante nas células dos mamíferos, é distribuído no citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria (Bond et al., 1987). A concentração de Mg^{2+} nos compartimentos celulares é estável, mesmo após estímulos hormonais ou metabólicos (Corkey et al., 1986; Bond et al., 1987; Fathollahi et al., 2000), o que mostra a importância da homeostase desse cátion para a regulação de enzimas dependentes de Mg^{2+} (Voma et al., 2014). Nos hepatócitos o transporte e homeostase do Mg^{2+} estão associados ao metabolismo da glicose. Dessa maneira, hormônios que regulam a glicólise e gliconeogênese, também atuam sobre as concentrações de Mg^{2+} (Fagan et al., 2000; Romani et al., 2000).

O Mg^{2+} também participa de outros processos metabólicos como glicólise, ciclo de Krebs, β -oxidação e transporte de íons através da membrana (Pasternak et al., 2010).

2.9.4 Proteína total plasmática e Albumina

A maior parte das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado, com exceção das imunoglobulinas, que são produzidas pelos linfócitos B (O'Connell et al., 2005). A albumina corresponde à maior fração proteica do plasma, que é composto também por outras proteínas tais como imunoglobulinas, fibrinogênio, proteínas de fase aguda, proteínas transportadoras e hormônios. Alterações na PTP podem ser observadas também devido à desidratação, inflamação ou fatores nutricionais. Outras doenças como mieloma, infecções, hepatites e desordens da medula óssea podem levar a um elevado nível de PTP. Baixa concentração de PTP pode estar relacionada com má – absorção, desnutrição, doença hepática e com diminuição da produção de albumina (Kaneko et al., 2000). A concentração das PTP também pode ser influenciada hormonalmente. Os hormônios de ação anabólica como, por exemplo, o hormônio do crescimento e os hormônios sexuais provocam elevação das PTP's. Os hormônios catabólicos como a tiroxina, por outro lado provocam redução das PTP's. Assim, animais mais velhos, apresentam menores valores de PTP's que animais jovens (Fayos et al., 2005).

A albumina sérica desempenha várias funções no organismo como, por exemplo, manutenção da pressão osmótica e pH sanguíneos (Figge et al., 1991; Carter e Ho, 1994; Leveille-Webster, 2004), transporte de moléculas como ácidos graxos, hormônios, drogas e íons metálicos (Peters, 1996), além de ser tida como o principal antioxidante plasmático do sangue (Roche et al., 2008). Possui estrutura tridimensional flexível que favorece sua ligação a esses vários componentes endógenos e exógenos, incluindo as EROs (Christodoulou et al., 1994; Oettl e Stauber, 2007;

Rondeau et al., 2007; Roche et al., 2008; Otagiri e Chuang, 2009; Varshney et al., 2011; Taverna et al., 2013; Rosas-Dias et al., 2015). As proteínas ingeridas na dieta, geralmente são metabolizadas e entram nas vias comuns de oxidação do acetil CoA, dessa forma, é necessário que se tenha uma fonte de disponibilidade rápida de aminoácidos para o turnover das proteínas periféricas. Sendo a albumina muito abundante, ela representa esta fonte de aminoácidos (Kaneko et al., 2000).

A albumina não é um marcador exclusivamente hepático. Em cães com alterações hepáticas crônicas, a hipoalbuminemia é esperada, mas existem outras disfunções nas quais existe diminuição do valor de albumina sérica como, por exemplo, enteropatias e nefropatias com perda de proteínas, além das lesões cutâneas exsudativas. Além disso, nutrição inadequada e doenças inflamatórias podem reduzir a síntese hepática de albumina (Leveille-Webster, 2004). Em animais desidratados há um aumento da concentração de albumina sérica, mas esse acréscimo é relativo, uma vez que não houve expansão da síntese de albumina, mas sim redução do volume sanguíneo (Cooper et al., 2009). A hiperalbuminemia primária é rara, entretanto, Cooper e colaboradores (2009), relataram um caso de hiperalbuminemia em cão com carcinoma hepatocelular que, foi revertida após retirada cirúrgica do tumor.

2.9.5 Colesterol e triglicerídeos

A concentração de lipídeos no sangue é medida na rotina clínica para avaliar a saúde dos animais. O colesterol total e os triglicerídeos são utilizados nessa avaliação e o aumento de ambos pode indicar obesidade, alterações metabólicas, estresse oxidativo, inflamação e mudanças no perfil lipídico (Mori et al., 2011; Kawasumi et al., 2014). A lipidemia é também influenciada pela idade, raça, dieta, sexo, ciclo circadiano e algumas doenças que provocam inflamação, estresse oxidativo, resistência à insulina, e mudanças de perfil lipídico como, por exemplo, diabetes mellitus, hiperadrenocorticismo e hipotireoidismo (Bertolucci et al., 2008, Mori et al., 2010; Mori et al., 2011; Kawasumi et al., 2014; Usui et al., 2014).

O HDL (High Density Lipoprotein) é o tipo de colesterol dominante em cães. Em humanos obesos ocorre uma diminuição de HDL e um aumento de LDL (Low Density Protein), em cães obesos ocorre o aumento de ambos (Tvarijonaviciute et al., 2012). Tvarijonaviciute e colaboradores (2012) sugerem que a prevalência de cães com distúrbios metabólicos associados a obesidade (ORMD), com síndrome metabólica (SM) seja pouco menor que a prevalência de SM humana (22-28% e 50-60% em pacientes com sobrepeso ou obesos, respectivamente). Cães com ORMD apresentaram uma diminuição da adiponectina e um aumento da insulina sérica, sendo semelhante a humanos com SM. Não foram identificadas diferenças na massa gorda entre cães classificados com ou sem SM, implicando que a obesidade canina não leva inevitavelmente à disfunção metabólica, e é similar aos achados em humanos, onde alguns indivíduos obesos são metabolicamente saudáveis.

2.9.6 Glicose

A glicose fornece energia às células e seu metabolismo para geração de ATP pode ocorrer tanto por respiração aeróbia, quanto anaeróbia. Nos mamíferos, alguns tecidos utilizam de maneira estrita a glicose como fonte de energia como, por exemplo, o cérebro (Wasserman, 2009; Thorens, 2011). A corrente sanguínea é utilizada para distribuir a glicose proveniente da dieta, de reservas endógenas ou da gliconeogênese aos tecidos. De acordo com a ingestão de alimentos e demanda de energia, mecanismos avançados de regulação estão disponíveis em organismos saudáveis para a manutenção de níveis constantes da glicemia (Suh et al., 2007;

Wasserman, 2009; Thorens, 2011). Dois hormônios são os principais responsáveis por essa refinada regulação, a insulina e o glucagon. Quando os níveis de glicose sanguínea estão elevados, a insulina a direciona para as células que irão utilizá-la para produção de energia ou armazenamento. Quando esses níveis abaixam e não existe fonte exógena de glicose, o glucagon mobiliza as reservas localizadas no fígado e músculos em forma de glicogênio afim de prevenir a hipoglicemia (Bansal e Wang, 2008; Wasserman, 2009).

3. Materiais e métodos

O presente projeto recebeu parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais - (CEUA-UFMG) sob protocolo de nº 237/2014.

3.1 Animais

Foram utilizados 21 cães de diferentes raças (18 fêmeas e três machos), com peso médio de 25,4kg±12,2 (mín. 3,3; máx. 60kg) de proprietários particulares residentes em Belo Horizonte, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Esses animais foram divididos em três grupos da seguinte forma:

- Grupo de auto-hemoterapia (AHm): Cinco animais, sendo três fêmeas e dois machos.
- Grupo de auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3): Dez animais, sendo nove fêmeas e um macho.
- Grupo de insuflação retal (IR): Seis animais, todas fêmeas.

3.2 Geração do ozônio

Para a formação do O₃ medicinal, foi utilizado um aparelho gerador de O₃ (Ozone and Life, modelo OeL1.5RM, São José dos Campos, Brasil), acoplado a um cilindro de O₂ medicinal. O aparelho permite que na saída seja acoplado um filtro biológico (Millipore®, 0,22µm) para garantir a esterilidade da mistura gasosa que foi coletada por uma seringa acoplada a esse filtro. Com esse aparelho é possível produzir misturas O₂-O₃ em concentrações que vão de 1 a 70 mg de O₃ por litro, em uma mistura com no mínimo 95% de O₂ e 5% de O₃. Com o gerador desligado, ocorre saída de O₂ medicinal puro.

3.3 Tratamentos

Em todos os grupos foram realizados dez tratamentos com intervalos de 48 horas entre cada um. Os tratamentos e coletas de material foram realizados em domicílio, da seguinte maneira:

Grupo AHm: Após assepsia local, foram coletados cinco mL de sangue da veia cefálica ou jugular, sem anticoagulante, por punção venosa com escalpe 21G ou 19G, de acordo com o porte do animal. Após a coleta, o sangue era agitado durante dez segundos e aplicado por via intramuscular, na musculatura posterior da coxa, sempre alternando os lados das aplicações e das coletas.

Grupo AHmO3: Após assepsia local, foram coletados cinco mL de sangue da veia cefálica ou jugular, sem anticoagulante, por punção venosa com escalpe 21G ou 19G, de acordo com o porte do animal. Imediatamente, a essa amostra eram adicionados cinco mL de O₃ na concentração de 32mg/L, conforme indicação de Bocci (2005) e Viebahn-Hänsler et al. (2012).

A mistura era agitada durante dez segundos e aplicada por via intramuscular, na musculatura posterior da coxa, sempre alternando os lados das aplicações e das coletas.

Grupo IR: Foram utilizadas sondas uretrais número 12, lubrificadas com lubrificante íntimo comercial (Olla®) para a IR. Aproximadamente 15cm da sonda era introduzida no orifício anal. O O₃ era, então, injetado na dose de 43µg de O₃/kg (Rodekohl e Kübler, 2009). Após a insuflação, a sonda era mantida no reto do animal por um minuto e a cauda desses era tracionada em sentido cranioventral para mantê-la no lugar. Após esse tempo, a sonda era retirada.

3.4 Testes laboratoriais

Para o acompanhamento dos tratamentos foram realizadas coletas de sangue em três momentos em todos os animais.

Tempo zero: Antes do início dos tratamentos.

Tempo um: 48 horas após o quinto tratamento (imediatamente antes do sexto).

Tempo dois: 48 horas após o décimo tratamento.

O sangue foi coletado por punção venosa da veia cefálica, após assepsia local, em um tubo com EDTA e outro sem anticoagulante, ambos utilizando sistema de coleta à vácuo (Vacutainer®). As amostras foram levadas ao laboratório de Patologia Clínica da EV-UFGM.

Os tubos de EDTA foram homogeneizados e o sangue foi processado para contagem celular sanguínea por impedância em aparelho automático (Abacus Jr. Vet-Diatron), confecção de microcapilar para determinação do VG e proteína total, esfregaço sanguíneo em lâmina para contagem diferencial e observação morfológica celular. Das mesmas amostras, com EDTA, foram realizadas mensuração de GSH-Px e SOD.

Os tubos microcapilares foram centrifugados a 10000rpm durante cinco minutos e o VG foi determinado utilizando uma escala própria de leitura, conforme técnica de rotina do laboratório. A mensuração da PTP foi feita por refratometria. As lâminas foram coradas (Panótico Rápido-Newprov, Brasil) e analisadas através de microscopia óptica.

A análise para determinação da concentração de SOD foi realizada segundo instruções do fabricante do reagente (RANDOX-Reino Unido) e consistia em centrifugar 0,5mL de sangue total por dez minutos a 3000rpm e aspirar o plasma. Os eritrócitos eram então lavados por quatro vezes com um mL de solução salina a 0,9% e centrifugados a 3000rpm por dez minutos após cada lavagem e retirada do sobrenadante. Aos eritrócitos lavados eram adicionados 2 mL de água fria bidestilada e a mistura era mantida sob refrigeração (4°C) durante 15 minutos. A água bidestilada era aspirada e a 0,5 mL do diluidor fornecido pelo fabricante, foram adicionados 15µl da papa de eritrócitos. Essa mistura foi analisada por espectrofotometria em aparelho automático (Cobas Mira Plus-Roche), utilizando-se 500nm como comprimento de onda.

Para a mensuração da GSH-Px, foi utilizado um kit comercial (RANDOX-Reino Unido). O processamento da amostra consistiu em adicionar 1mL do diluidor fornecido pelo fabricante a 50µl de sangue total. Após cinco minutos foi adicionado um mL de corante de Hb e as amostras foram analisadas por espectrofotometria em aparelho automático (Cobas Mira Plus-Roche), seguindo as recomendações na bula do fabricante. Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 2000rpm para retirada do soro que foi utilizado para as análises bioquímicas. A bioquímica clínica foi realizada por espectrofotometria em aparelho automático (Cobas Mira Plus-Roche) e as variáveis avaliadas foram: ALT, AST, ácido úrico, colesterol, triglicérides, glicose, uréia, creatinina, LDH (Synermed International, EUA), bilirrubina total, cálcio, Mg²⁺,

albumina, ALP e PTP (RANDOX, Reino Unido). O preparo dos reagentes, bem como as técnicas de análise seguiu as indicações dos respectivos fabricantes.

3.5 Análise Estatística

O experimento foi inteiramente casualizado, sendo os animais dos diferentes tratamentos avaliados em três tempos distintos. Os dados foram tabelados e avaliados segundo a normalidade e homocedasticidade (Kolmogorov- Smirnov e Shapiro-Wilks). As variáveis que não apresentaram distribuição paramétrica ($SW < 0,05$) passaram por transformação logarítmica (\log_{10}) para serem submetidas a ANOVA utilizando-se o programa SAS. As variáveis que não puderam ser transformadas foram submetidas a avaliação pelo teste Kruskal Wallis ou Wilcoxon. A margem de significância foi de 95% ($p < 0,05$) para todas as variáveis.

4. Resultados e Discussão

No decorrer das fases de tratamentos em dois animais do grupo AHmO3 a punção venosa era complicada e esses desenvolveram flebite nos locais de coleta, um outro animal do mesmo grupo apresentou claudicação em uma aplicação intramuscular, em ambos os casos esses problemas foram contornados trocando os locais de punção e aplicação.

4.1 Hemograma

Segundo Kaneko et al. (2000) os componentes celulares do sangue podem refletir, precocemente, alterações sistêmicas, ou mesmo respostas locais do organismo, entretanto raramente são achados patognomônicos. A rapidez e a facilidade em se realizar um hemograma o tornam uma importante ferramenta para definição de condutas clínicas. Dessa forma o hemograma foi o primeiro exame a ser realizado neste experimento, desde a triagem dos animais. Segundo León et al., 1998; Bocci, 2004b; Bocci et al., 2011, a oxigênio-ozonioterapia pode melhorar o sistema antioxidante de eritrócitos e também estimula a resposta imune (Sagai e Bocci, 2011), o que poderia alterar os resultados do hemograma de animais submetidos a oxigênio-ozonioterapia. Os resultados dos hemogramas dos animais avaliados, neste experimento, encontram-se nas Tab. 1 e 2.

Tabela 1: Valores médios seguidos do desvio padrão da contagem eritrócitos e determinação do volume globular e concentração de hemoglobina, de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).

Tratamento	Tempo*		
	Zero	1	2
Volume globular (%)- 37-55 (Jain, 1993)			
AHm	48,600±4,561Aa	47,800±3,493Aa	46,200±5,675Aa
AHmO3	48,100±5,820Aa	43,600±4,624Ab	44,600±4,858Aab
IR	48,667±5,888Aa	44,000±7,563Aab	40,667±9,933Ab
Eritrócitos (x 106/ μ L)- 5,5-8,5 (Jain, 1993)			
AHm	6,828±0,862Aa	6,740±0,552Aa	6,364±0,939Aa
AHmO3	6,871±1,176Aa	6,274±0,998Ab	6,126±0,814Ab
IR	7,083±0,876Aa	6,232±1,296Ab	6,162±1,349Ab
Hemoglobina (g/dL)- 12-18 (Jain, 1993)			
AHm	15,920±1,558Aa	16,060±1,282Aa	15,380±2,275Aa
AHmO3	15,670±2,254Aa	14,830±2,119Aa	14,680±1,978Aa
IR	17,033±1,617Aa	13,883±3,294Ab	14,517±2,885Ab

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas ($p \leq 0,05$).

O volume globular (VG%) foi equivalente entre os grupos em todos os tempos de avaliação, demonstrando diferença apenas nos tratamentos que receberam O3, durante a evolução temporal. Os animais do AHmO3 apresentaram diminuição do VG (%) no T1, enquanto animais do grupo IR apresentaram redução da variável em T2 (Fig.1). Uma vez que o grupo AHm não apresentou alteração, parece haver influência do O3 sobre esta variável, dependendo da via de aplicação. O VG (%) representa a massa de eritrócitos compactados no volume de sangue total, dessa forma, a contagem de eritrócitos é a variável inicial que influencia no VG (%). Diferenças estatísticas significativas também foram observadas na contagem de eritrócitos dos animais dos mesmos grupos, a partir do T1, se mantendo em T2 (Fig.2).

A literatura consultada considera que os eritrócitos sejam resistentes a baixas doses de O3 (Shinriki et al.,1998; Bocci, 2004b; Travagli et al., 2006, Travagli et al., 2007). Entretanto, Bocci (2002), embora não tenha observado edema ou lise de eritrócitos, *in vitro*, relata a ocorrência de pequena hemólise, semelhante a que ocorre em amostras de sangue estocado. O VG(%) determina, inicialmente a presença de anemia, quando os valores se encontram abaixo dos intervalos de referência para a espécie. Neste experimento foram observadas médias de VG(%) abaixo dos intervalos (37-55%) relatados pela literatura (Jain, 1993) em dois animais do grupo IR. Mesmo havendo redução do VG(%) e do número de eritrócitos das amostras sanguíneas de cães submetidos a oxigênio-ozonioterapia, apenas um animal demonstrou anemia ou característica compatíveis com hemólise *in vivo*, que pode ter sido decorrente da hemoparasitose. O restante dos resultados está de acordo com os relatos de estudos realizados *in vitro*.

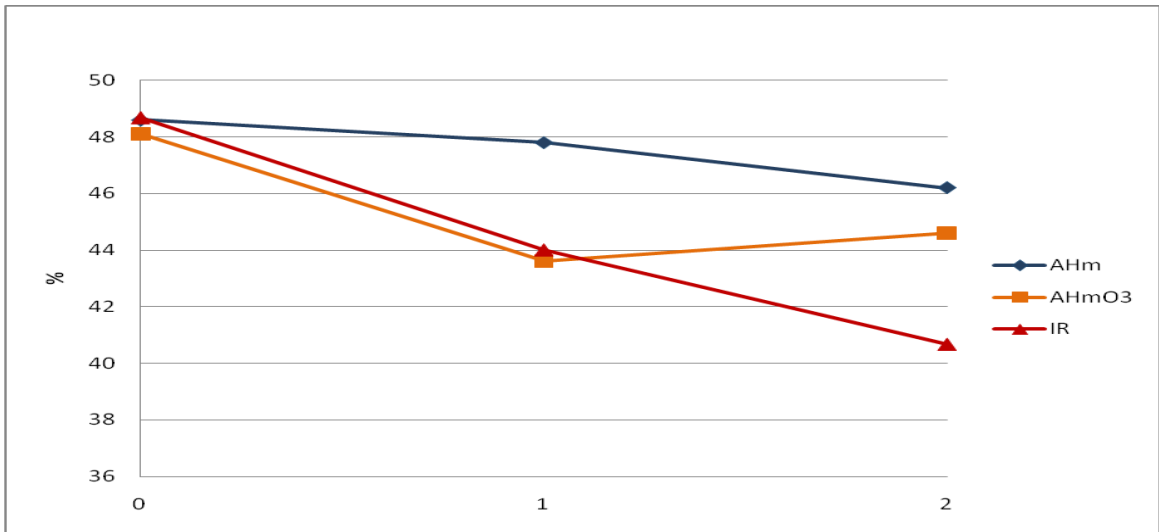


Fig.1: Volume globular (%) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

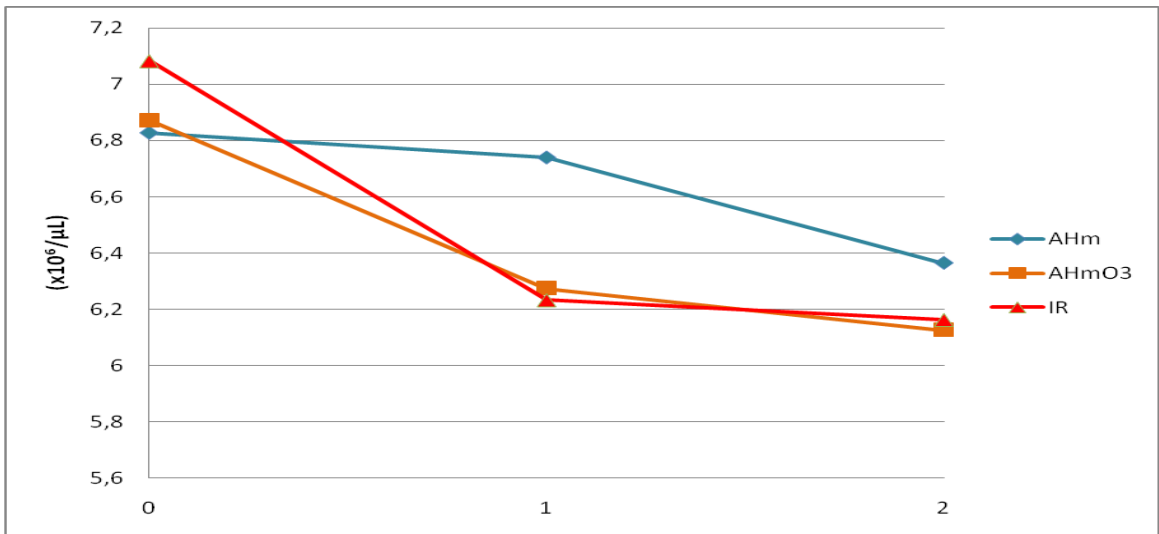


Fig.2: Concentração de eritrócitos (x10⁶/μL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

Com relação a variável hemoglobina (Hb) as únicas diferenças observadas foram nos animais do grupo IR nos tempos T1 e T2 (Fig.3). Dois dos seis (33%) animais deste grupo apresentaram soropositividade para *Leishmania* sp. e sinais clínicos compatíveis com hemoparasitoses, embora não tenham sido observados em lâmina. Se considerarmos os intervalos de confiança entre 12 e 18 g/dL (Jain, 1993), alguns animais apresentaram valores abaixo. A redução da concentração de Hb caracteriza o processo de anemia, entretanto, nos animais deste experimento não incorreram em redução clinicamente significativa do VG(%).

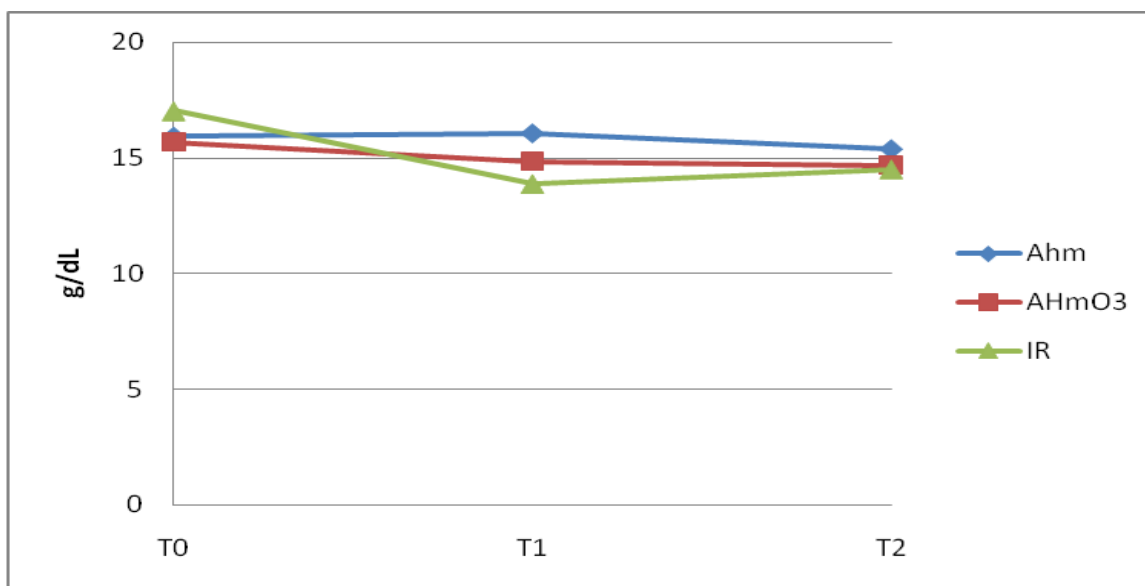


Fig. 3: Concentração de hemoglobina (g/dL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

O número amostral reduzido no grupo IR e a intercorrência de hemoparasitoses comprometeram os resultados. Mas pode-se sugerir que a meia vida do eritrócito tenha sido reduzida por alterações conformacionais da membrana ou mesmo da molécula de Hb, devido ao estresse oxidativo, ou mesmo alteração do sistema tampão, uma vez que a Hb age em diversas reações bioquímicas.

Houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre grupos para a variável leucócitos totais no tempo zero (Tab.2), não sendo observada nos demais tempos de avaliação ou entre grupos na evolução do tempo. Dessa forma, embora a resposta leucocitária sugira um diagnóstico diferencial (Jain, 1993), a causa da diferença não pode ser atribuída ao tratamento, já que se tratava do tempo prévio às aplicações. Provavelmente, a diferença se deveu a leucocitose observada em quatro dos dez (40%) animais do grupo AHmO3, que apresentaram 18,5, 20,3, 20,7 e 28,1 ($\times 10^3/\mu\text{L}$) leucócitos totais. Um animal (16,6%) do grupo IR apresentou leucopenia ($4,43 \times 10^3/\mu\text{L}$). Os valores da leucometria total dos animais do grupo AHmO3 diminuiram gradativamente durante os tempos subsequentes de avaliação, chegando aos valores de referência ($6,0-17,0 \times 10^3/\mu\text{L}$), no tempo 2 (Fig.4). Bastonetes e basófilos foram achados esporádicos, e em nenhum tempo ou tratamento, bem como na avaliação individual, apresentaram-se acima dos intervalos de referência para a espécie canina. Dessa forma não foram realizadas análises estatística dessas variáveis.

Tabela 2: Valores médios seguidos do desvio padrão da contagem de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos de cães hígdos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).

Tratamento	Tempos*		
	Zero	1	2
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)- 6000-17000 (Jain, 1993)			
AHm	10,584 \pm 2,464Ba	11,008 \pm 3,442Aa	9,910 \pm 3,313Aa
AHmO3	16,8 \pm 5,128Aa	14,751 \pm 3,556Aa	15,016 \pm 4,307Aa
IR	8,972 \pm 3,519Ba	9,275 \pm 5,269Aa	9,327 \pm 6,031Aa
Neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)- 3000-11500 (Jain, 1993)			
AHm	6227,8 \pm 673,7Ab	6385,2 \pm 2647,1Aa	6223,9 \pm 2653,7Aab
AHmO3	9141,7 \pm 2486,5Aa	9074,7 \pm 2817,1Aa	9758,0 \pm 3603,0Aa
IR	5981,7 \pm 2187,2Aa	6664,1 \pm 2647,1Aa	5741,6 \pm 3018,9Aa
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)- 1000-4800 (Jain, 1993)			
AHm	2310,8 \pm 1738,4Aa	3080,7 \pm 1428,1Aa	2379,1 \pm 1412,5Aa
AHmO3	3570,8 \pm 1203,1Aa	1534,7 \pm 606,2Ab	1802,6 \pm 736,4Ab
IR	1647,2 \pm 783,4Aa	1293,2 \pm 1490,8Aa	1976,2 \pm 1507,3Aa
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)- 150-1350 (Jain, 1993)			
AHm	882,5 \pm 337,4Aa	523,9 \pm 416,8Ab	658,7 \pm 332,2Aa
AHmO3	1112,3 \pm 701,7Aa	864,8 \pm 504,4Ab	1065,8 \pm 537,9Aab
IR	546,2 \pm 546,3Aa	542,8 \pm 404,3Aa	796,7 \pm 537,9Aa
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)- 100-1250 (Jain, 1993)			
AHm	1101,5 \pm 746,4Ab	1558,6 \pm 1082,3Aa	1194,1 \pm 376,5Ab
AHmO3	2752,5 \pm 2405,9Aa	1714,4 \pm 1111,8Aa	1794,9 \pm 692,7Ab
IR	796,5 \pm 899,5Aa	774,7 \pm 605,9Aa	717,5 \pm 1043,8Aa

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas ($p \leq 0,05$).

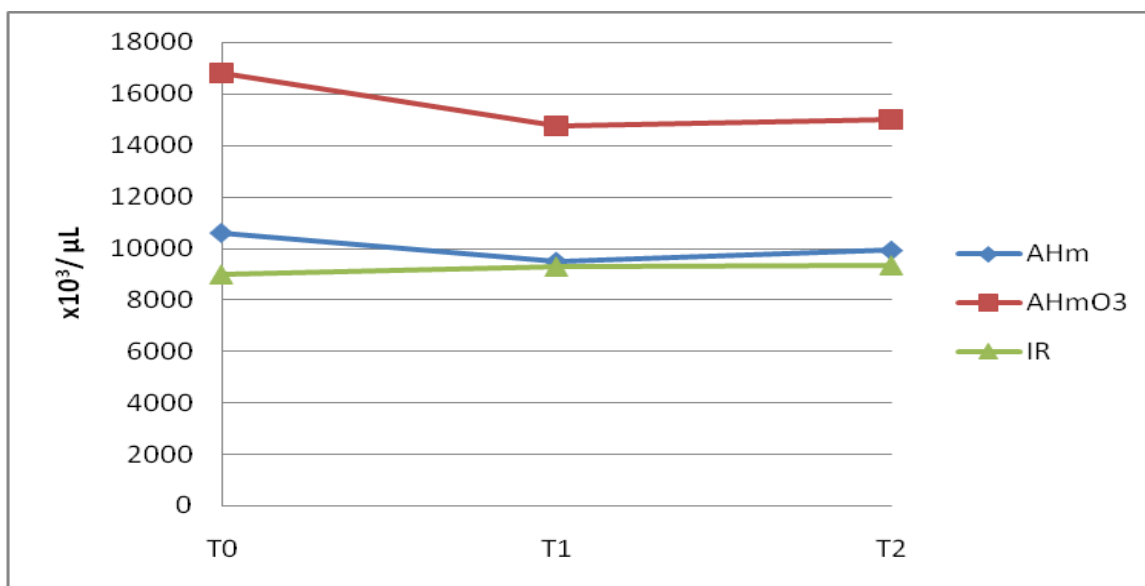


Fig.4: Contagem de leucócitos($\times 10^3$) de cães hígdos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

O estresse é uma das causas mais frequentes de leucocitose em cães e, pode ser caracterizado pela presença de neutrofilia, monocitose, linfopenia e eosinopenia, relacionados ao derrame de hormônios esteróides, como o corticóide de origem endógena, frente a estímulos como medo, apreensão ou dor (Jain, 1993; Stockham e Scott, 2008). Três animais do grupo AHmO3 apresentaram neutrofilia no início das avaliações o que elevou a média do grupo (Tab. 2), entretanto, mesmo mantendo a média alta, não foi demonstrada diferença estatística significativa entre os grupos nos diferentes tempos de avaliação. A neutrofilia observada, em

conjunto como a monocitose só foi coincidente em um animal, diagnosticado no transcorrer do experimento como sendo leishmaniose positivo. Nenhum animal apresentou linfopenia no T0, entretanto dois animais dos grupos AHmO3 e IR apresentaram este achado no T1 e um animal do grupo AHm. Três animais do grupo AHm apresentaram linfopenia em T2, outros dois em AHmO3 e apenas um animal do grupo IR. A linfopenia não foi um achado coincidente nos animais com neutrofilia ou monocitose. Sendo assim, os achados característicos de processo inflamatório agudo (leucocitose neutrofílica) ou ação do hormônio esteróide sob efeito do estresse da coleta, não podem ser incriminados nos achados. Melhor explicação seria leucocitose fisiológica da ação adrenérgica, que como mencionam Jain (1993) e Stockham e Scott (2008), altera transitoriamente e, inicialmente, neutrófilos circulantes. Dependendo da contração esplênica, também pode haver mobilização temporária, de outros tipos celulares que, como se encontram em contagem reduzida se comparados a do neutrófilo, sofrem menores alterações quantitativas.

A linfocitose (>4800/uL) só foi observada no T0 e, em 3 animais. Segundo Sagai e Bocci (2011), o O₃ modula a resposta imune, podendo tanto suprimir quanto estimular a resposta imune, não pelo acréscimo celular, mas pelo perfil de citocinas produzidas (Jakab et al., 1995; Bocci, 1996b; van Hoof et al., 1997). A linfocitose é relatada em casos de inflamação crônica, seguida ou não de infecção, desordens linfoproliferativas ou pelo desvio fisiológico ocasionado pela ação adrenérgica (Stockham e Scott, 2008), que parece ter sido o caso dos animais deste experimento.

Pôde-se observar monocitose em seis animais em T0, quatro deles pertencentes ao grupo AHmO3, dois deles se mantiveram monocitóticos em T1 e normalizaram em T2. Os animais que apresentaram monocitose em T0 também apresentavam neutrofilia e eosinofilia e, gradativamente tiveram os valores reduzidos após o tratamento ao longo do tempo. O O₃ associado ao sangue em infusão intramuscular, reduziu a concentração de monócitos e outros tipos celulares, sugerindo modulação do processo inflamatório inespecífico, da mesma maneira observada por Caó (2013).

Os eosinófilos se mostraram instáveis durante todo o período de avaliação, com um coeficiente de variação de 89%, valores mínimos de zero e máximo de 8.711/uL. No início do experimento (T0) 14 animais apresentaram valores acima do intervalo de referência (100-1.250/uL). Segundo Jain (1993) são causas de eosinofilia: hipersensibilidade, parasitose, inflamação, hipoadrenocorticismo e leucemia eosinofílica. A eosinofilia esteve coincidente com a neutrofilia em quatro animais no T0, três destes componentes do grupo AHmO3, no T1 três animais apresentaram neutrofilia coincidente com eosinofilia, todos do grupo AHmO3 e dentre estes, apenas um animal era recorrente de T0. Em T2 apenas um animal, e do grupo IR, apresentou eosinofilia. Embora os animais selecionados para participarem do experimento tenham sido clinicamente avaliados, e considerados hígidos, nenhum protocolo de vermifugação foi adotado previamente ao início do experimento. Dessa forma, dentre as causas de eosinofilia mencionadas pelos autores, existe a possibilidade de os animais terem processos inflamatórios subclínicos e/ou parasitários. Três animais apresentaram eosinopenia, que não esteve associada a neutrofilia e/ou linfopenia, para caracterizar o estresse, já mencionado anteriormente.

4.2. Bioquímica clínica

Os resultados do perfil bioquímico dos cães deste experimento encontram-se expressos nas tabelas de 3 a 9. Foram determinadas as concentrações de proteínas totais, albumina (Tab.3), colesterol, triglicerídeos (Tab.4) e glicose (Tab.5), como macromoléculas orgânicas; enzimas séricas (Tab.6), metabolitos (Tab.8), e minerais (Tab.9) (González et al., 2001). Além dos parâmetros sugeridos, foram determinadas, também, as concentrações de ácido úrico (Tab.8) e

das atividades das enzimas do perfil anti-oxidante (Tab.7). Os valores adotados como intervalo de referência encontram-se nas tabelas para efeito de comparação, extraídos de Kaneko et al. (2000).

Não foram observadas diferenças significativas nos resultados da concentração de albumina sérica quando os tempos de grupos diferentes foram comparados (Tab. 3). Por outro lado, no grupo AHmO3 houve diminuição significativa entre os tempos 0 e 2, assim como no grupo IR houve uma diminuição significativa a partir de T1 (T0<T1<T2) (Fig.5). Também ocorreu diminuição significativa da proteína total nos grupos tratados com O₃, especialmente em T2. Uma vez que a albumina está incluída na mensuração da proteína total, é esperado que os valores de ambas tenham o mesmo desenho, como verificado nesse trabalho (Fig.6).

Tabela 3: Valores médios seguidos do desvio padrão da concentração de proteína total plasmática (g/dL) e albumina (g/dL) de cães hígdos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).

Tratamento	Tempos*		
	Zero	1	2
Proteína total plasmática (g/dL)-5,4-7,1 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	7,91±0,88Aa	7,89±1,20Aa	7,04±0,64Aa
AHmO3	8,52±0,88Aa	7,94±1,18Aab	7,56±1,28Ab
IR	8,24±0,81Aa	7,79±1,30Aab	6,85±0,79Ab
Albumina (g/dL)-2,6-3,3 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	3,29±0,52Aa	3,33±0,28Aa	2,95±0,16Aa
AHmO3	3,63±0,38Aa	3,44±0,45Aab	3,26±0,38Ab
IR	3,82±0,58Aa	3,28±0,45Ac	2,81±0,54Ab

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas (p≤0,05).

Alterações nas concentrações de PTP, bem como albumina, podem ser observadas em situações em que haja desidratação, inflamação ou processos de desequilíbrio entre ingestão e consumo, relacionadas, comumente com má – absorção, desnutrição, doença hepática e com diminuição da produção de albumina (Kaneko et al., 2000). Como as proteínas desempenham inúmeras atividades orgânicas, sua concentração deve ser mantida dentro do intervalo de referência para que o organismo possa manter a homeostase, dessa forma reduções significativas, normalmente veem acompanhadas de sinais clínicos e podem estar associados a disfunção hepática, processos neoplásicos e/ ou perdas intestinais abruptas (Fayos et al., 2005). Nenhum animal apresentou concentrações de PT abaixo de 5,4mg/dL, apenas um animal do grupo IR apresentou concentração de albumina igual a 2mg/dL. A maioria dos animais apresentaram valores acima de 7,1 de PT e 3,3 de albumina. Segundo Kaneko et al. (2000) os valores de PTP e albumina podem variar muito considerando-se espécie, raça, tamanho e catabolismo. Nenhum animal demonstrou histórico ou exame clínico compatível com desidratação, que justificasse as concentrações acima dos intervalos de referência da literatura.

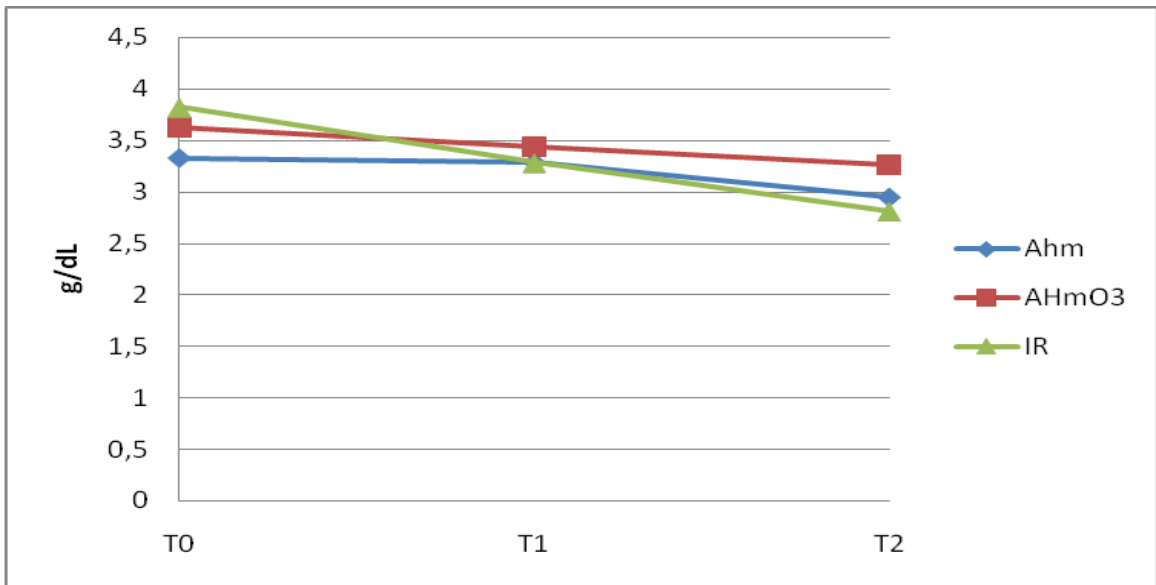


Fig.5: Albumina sérica (g/dL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

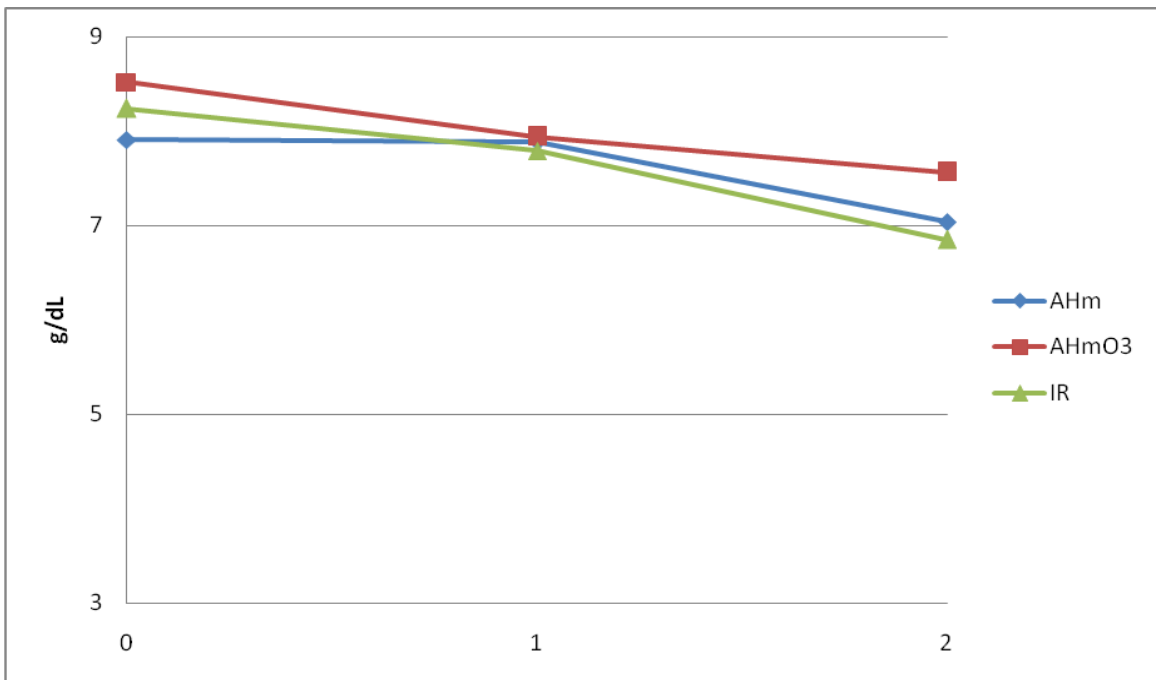


Fig.6: Proteína Total plasmática-PTP (g/dL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

Quanto a significativa diferença estatística observada entre os diferentes tempos dentro dos grupos tratados, foi demonstrado que o estresse oxidativo causa alterações na conformação da albumina sérica em humanos (Anraku et al., 2001; Musante et al., 2006) assim, o sítio de

ligação do reagente colorimétrico utilizado pode ter sido modificado com os tratamentos, o que poderia justificar a redução significativa das médias encontradas entre os tempos T0 e T2.

Oettl e colaboradores (2008) realizaram estudo com pacientes cirróticos e observaram que a diminuição da concentração sérica de albumina está relacionada, não apenas com a diminuição da síntese dessa proteína, mas também ao estresse oxidativo que modifica a conformação da mesma. Gomes-Marcondes e Tisdale (2002) constataram que um pequeno estresse oxidativo induz o catabolismo protéico muscular, mas não avaliaram a albumina nem a proteína total. De acordo com Halliwell e Gutteridge (1990) as moléculas de albumina danificadas são removidas da circulação sanguínea e degradadas, o que também poderia justificar os resultados encontrados apenas nos animais dos grupos que receberam O₃. Apesar das diferenças observadas nos valores de triglicerídeos entre tempos e tratamentos, não foram encontradas diferenças significativas nos resultados do colesterol total (Tab.4). Pode-se esperar uma diminuição que acompanhasse os triglicerídeos, mas, provavelmente os tempos de avaliação não permitiram que essa mudança fosse observada da mesma forma como relataram Hernández e colaboradores (1995) em estudo com humanos cardiopatas demonstrando diminuição do colesterol após 15 sessões de auto-hemoterapia maior ozonizada.

Tabela 4: Valores médios seguidos do desvio padrão da concentração de colesterol (mg/dL) e triglicerídeos (mg/dL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).

Tratamento	Zero	Tempos*	
		1	2
Colesterol total (mg/dL)-40-78 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	59,50±11,88Aa	57,51±5,35Aa	55,71±7,59Aa
AHmO3	63,54±14,17Aa	63,99±16,63Aa	61,59±11,08Aa
IR	73,49±15,80Aa	70,85±20,44Aa	64,67±23,24Aa
Triglicérides (mg/dL)- 20-112 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	96,94±46,76Bab	AHm	96,94±46,76Bab
AHmO3	104,34±45,60Ba	AHmO3	104,34±45,60Ba
IR	266,59±174,83Aa	IR	266,59±174,83Aa

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas (p≤0,05).

Os valores das concentrações de triglicerídeos encontrados no tempo 0 mostraram diferença significativa entre os grupos pois, no grupo IR, uma parcela foi perdida e duas amostras apresentaram soro lipêmico, o que fez com que a média desse grupo aumentasse muito. Nos tratamentos com O₃ houve diminuição significativa dos valores médios de triglicerídeos no T1. No T2 os valores encontrados nos grupos AHm e AHmO3 não mostraram diferença significativa quando comparados ao T0, mas o grupo AHm mostrou diferença entre os T1 e T2. O tratamento IR mostrou diminuição significativa em todos os tempos, chegando inclusive a valores dentro dos limites de referência para a espécie (Fig.7).

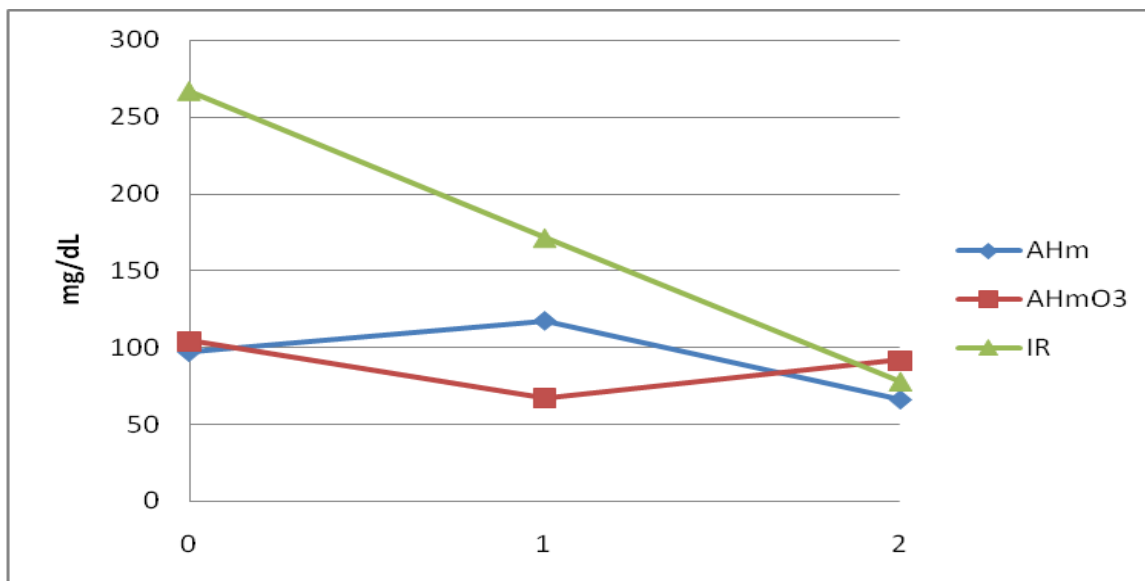


Fig.7: Triglicerídeos séricos (mg/dL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

Apesar de já ter sido demonstrado em humanos que a aplicação retal de O₃ tem efeito hipoglicemiante em diabéticos hiperglicêmicos (Al-Dalain et al., 2001; Martínez-Sánchez et al., 2005), no presente estudo não foi observada diferença no grupo IR e nos grupos de auto-hemoterapia foi identificado aumento significativo da glicemia (Tab.5). Pode-se sugerir que, em animais com o controle correto da glicemia, o O₃ e a auto-hemoterapia não alteraram os valores de glicose. Outro fator relevante foi a falta do controle do tempo de jejum destes animais. Embora as coletas tenham sido realizadas sempre no mesmo horário, os proprietários, nem sempre suspendiam a refeição com oito horas de antecedência, como o recomendado para a determinação da maioria dos analitos avaliados (Kaneko et al., 2000). Os triglicerídeos são moléculas que devem estar ligadas a proteínas (lipoproteínas) para que possam sofrer ação enzimática, liberar ácidos graxos de cadeia longa e entrar na via do citrato para gerar colesterol ao final. Sendo assim, comumente encontram-se elevados após a ingestão alimentar e/ou mobilização de gordura decorrente do catabolismo energético. Ambos podem justificar os valores elevados dos triglicerídeos observados neste experimento, já que a glicose também sofreu variação (Tab.5).

Tabela 5: Valores médios seguidos do desvio padrão da concentração de glicose (mg/dL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).

Tratamento	Tempos*		
	Zero	1	2
Colesterol total (mg/dL)-40-78 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	57,96±15,48Ab	58,80±10,22Bb	80,87±13,16Aa
AHmO3	61,14±13,32Ab	67,01±7,60ABab	75,95±11,27Aa
IR	70,66±23,13Aa	82,42±10,89Aa	75,89±12,39Aa

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas (p<0,05). Referência- 65-118 mg/dL(Kaneko et al., 2000).

Como ocorreu redução nos níveis de proteína e albumina, podemos sugerir que o aumento da glicemia pode ser uma compensação para disponibilizar energia, mas não podemos atribuir esse aumento nem ao tratamento com O₃, nem com a via utilizada. Nenhum animal apresentou

valores de glicemia acima do intervalo de referência, entretanto vários indivíduos apresentaram valores abaixo (65-118 mg/dL- Kaneko et al., 2000). Pode-se questionar se os valores de referência se aplicam aos animais nas condições deste estudo, ou se a falta do controle do jejum pode ter comprometido a variável, já que o menor valor observado foi de 37,8 mg/dL em um animal clinicamente hígado, sem restrição alimentar, em uma variável cujo coeficiente de variação médio foi 21% (Fig.8).

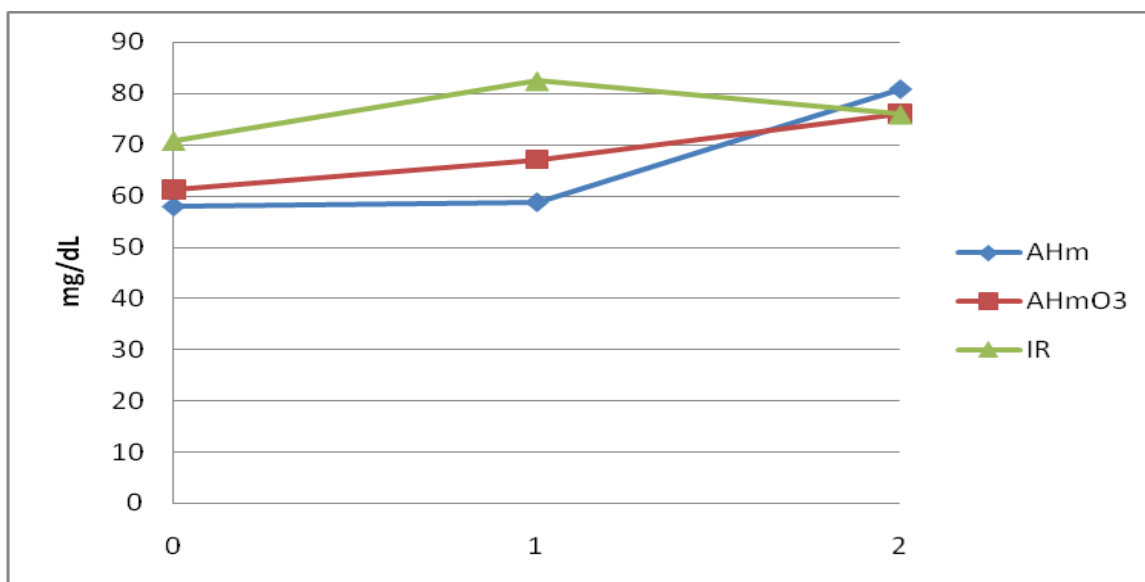


Fig.8: Glicose (mg/dL) de cães hígados submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

Segundo Gonzáles et al. (2001), deve-se incluir no perfil bioquímico a determinação da atividade das enzimas ALP, ALT e CK. No perfil bioquímico enzimático do presente estudo, além da ALP e ALT foram avaliadas a AST e a LDH (Tab.6)

Tabela 6: Valores médios seguidos do desvio padrão das atividades (U/L) de alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferases, fosfatase alcalina (ALP) e lactato desidrogenase (LDH) de cães hígados submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).

Tratamento	Tempos*		
	Zero	1	2
ALT (U/L)- 21-102 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	22,52±5,29ABa	9,55±2,68Ab	13,67±4,83Ab
AHmO3	19,37±9,39Ba	12,93±6,31Ab	9,50±5,01Bb
IR	40,41±15,97Aa	18,56±10,51Ab	29,26±10,01Aa
AST (U/L)-23-66 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	38,40±5,36Aa	38,20±3,19Aa	35,85±5,48Aa
AHmO3	39,79±4,69Aa	36,61±6,58Aa	36,01±3,76Aa
IR	45,85±3,08Aa	45,54±10,84Aa	31,99±14,12Ab
ALP (U/L)- 20-156 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	55,29±34,27Ba	53,06±26,18ABa	70,00±11,95Aa
AHmO3	39,64±21,54Ba	44,69±30,67Ba	59,80±27,42Aa
IR	209,30±8,55Aa	248,98±299,70Aa	214,92±455,66Ab
LDH (U/L)- 0-236 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	370,43±160,50Aa	331,04±98,92Aa	283,30±214,08Aa
AHmO3	363,02±216,32Aa	254,18±156,46Aa	343,05±280,38Aa
IR	620,73±250,26Aa	354,00±201,18Aa	478,17±331,61Aa

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas (p≤0,05).

Na avaliação das concentrações de AST nos tratamentos e tempos realizados nesse trabalho, foi observada diferença significativa no tempo 2 da IR em relação ao tempo zero do mesmo grupo (Tab. 6 e Fig.9). Houve uma redução estatística significativa na atividade da ALT em T1 dos animais de todos os grupos, sendo que no IR essa diferença deixou de existir em T2 (Fig.10).

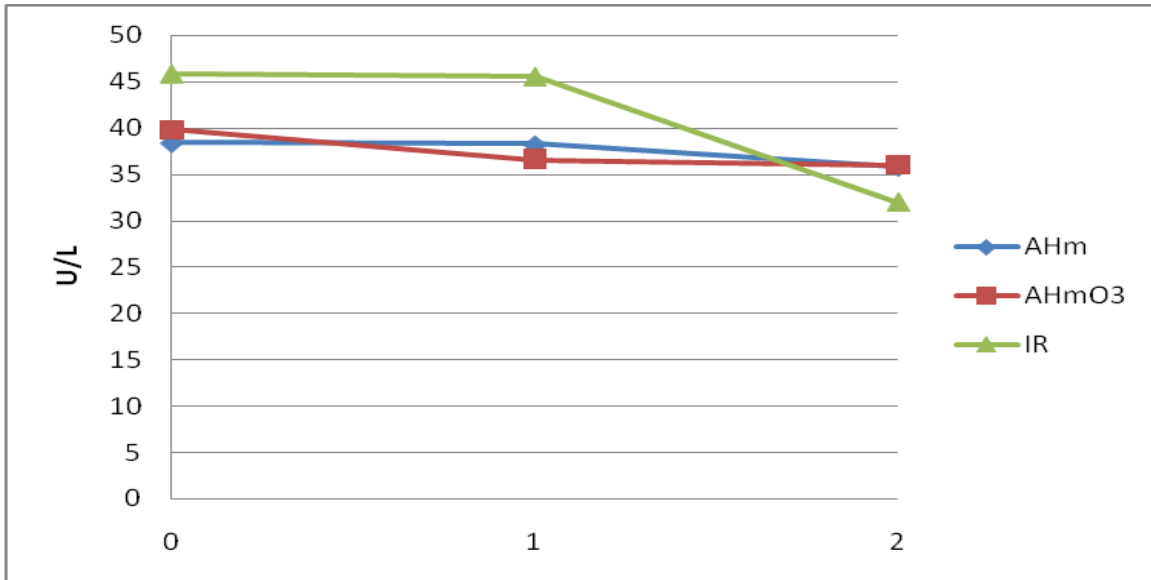


Fig.9: Concentração de aspartato aminotransferase-AST (U/L) de cães hígdos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

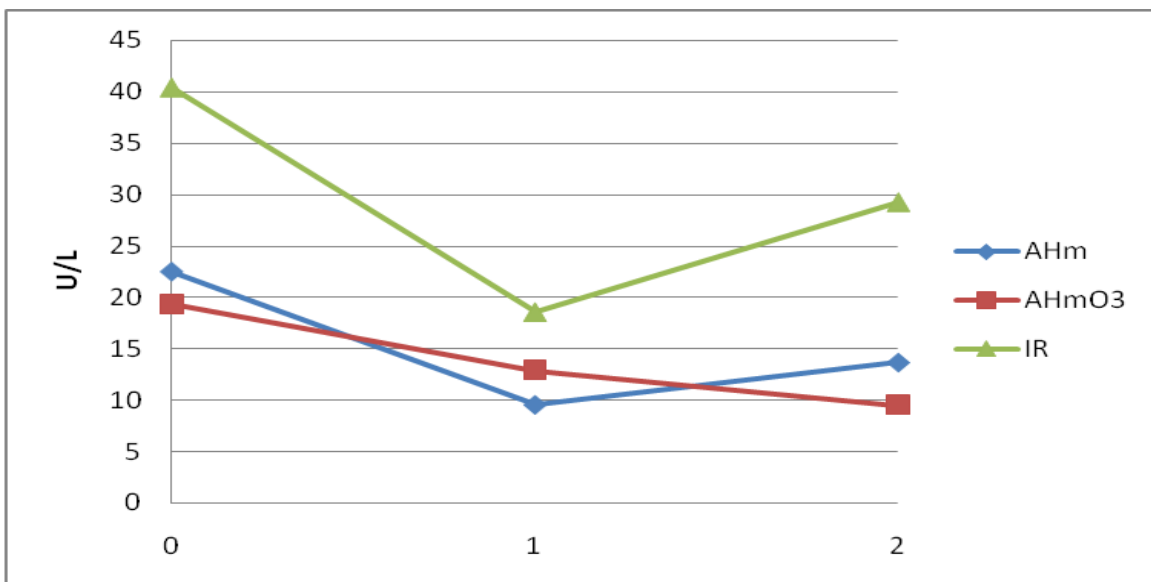


Fig.10: Concentração de alanina aminotransferase-ALT (U/L) de cães hígdos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

Estudo realizado por Zaky e colaboradores (2011) demonstrou que a administração de O₃ por via retal aumentou a oxigenação do sangue na veia porta e o metabolismo hepático de

propranolol em indivíduos com cirrose, mostrando que essa via de aplicação do O₃ tem efeitos benéficos no fígado, mas os resultados aqui apresentados não direcionam à mesma conclusão pois, os hepatócitos estavam íntegros e os resultados foram estatisticamente iguais nos mesmos tempos em diferentes tratamentos e se mantiveram dentro do intervalo de referência para a espécie.

Por existirem isoenzimas distribuídas em diversos tecidos, o aumento da atividade da ALP pode estar relacionado a inúmeros fatores. Em doenças hepáticas, a ALP é utilizada para diagnóstico de doenças colestáticas (Sanecki et al., 1993; Sykalima et al., 1997; Fernandez, 2007). Esta variável foi comprometida no presente experimento por uma conjunção de fatores. No T0 só foram mensuradas as atividades de dois animais do grupo IR, ambos apresentando aumento significativo (198,11 e 223,83 U/L), enquanto no grupo AHmO₃ um animal apresentou 3,22 e outro 1,42 U/L e no grupo AH uma animal apresentou 7,31U/L e houve uma parcela perdida. O coeficiente de variação médio do analito foi 76,6%, o que comprometeu a análise estatística. Valores extremamente elevados foram observados no grupo IR, onde havia um animal com hiperlipidemia e outro com hemoparasitose, ambas causas conhecidas de aumento expressivo na atividade da ALP. Dessa forma, não foi possível inferir nenhuma conclusão a respeito dos tratamentos para esta variável.

A enzima LDH tem sua maior atividade no músculo esquelético e é muito utilizada para indicar lesões musculares decorrentes de miosite ou trauma (Milne et al., 1987; Center, 2007). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nos valores dessa enzima, o que indica que as aplicações de sangue autólogo por via intra-muscular não causam lesões significativas.

Não foram encontrados artigos que descrevam os intervalos de normalidade para as enzimas do perfil antioxidante em cães. Na análise estatística dos dados da SOD foram encontradas diferenças significativas nos tratamentos com sangue autólogo. No grupo AHm ocorreu redução dos níveis dessa enzima no T1, mas no T2 houve um pequeno aumento, de forma que o valor encontrado foi estatisticamente igual ao valor do T0. Apesar desse aumento, o mesmo valor também não foi diferente do encontrado no T1, mas indica uma tendência de recuperação ou até de aumento. No grupo IR não foram observadas diferenças significativas (Fig.11).

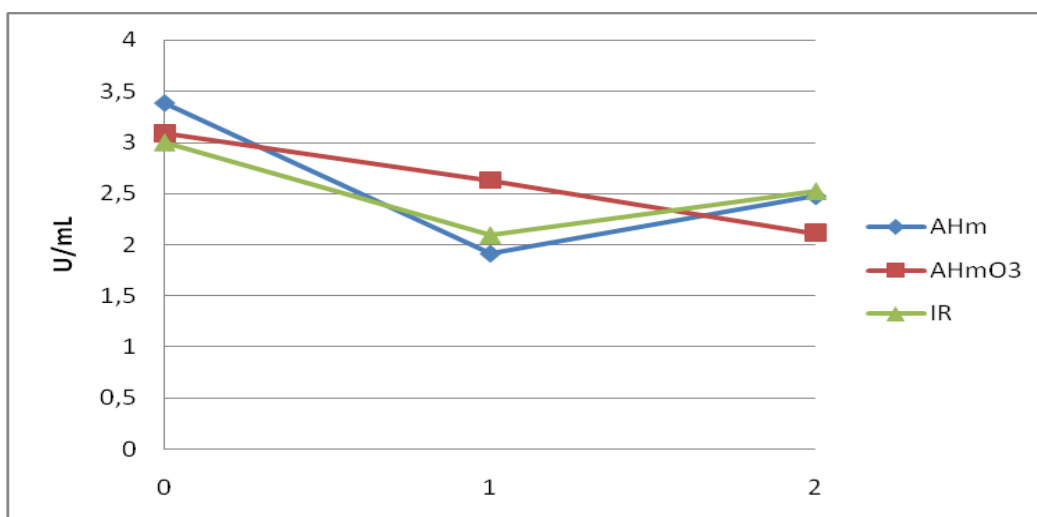


Fig.11: Concentração de superóxido dismutase-SOD (U/mL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO₃) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

Tabela 7: Valores médios seguidos do desvio padrão das atividades de superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px) de cães hígdios submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).

Tratamento	Tempos*		
	Zero	1	2
Superóxido dismutase (U/mL)			
AHm	3,38±0,39Aa	1,91±0,46Ab	2,47±0,80Aab
AHmO3	3,09±0,33Aa	2,63±1,16Aab	2,11±0,61Ab
IR	3,00±0,62Aa	2,09±0,65Aa	2,52±0,63Aa
Glutaciona peroxidase (U/L)			
AHm	333,45±12,77Ab	1495,22±231,29Aa	1475,03±270,70Aa
AHmO3	324,79±39,60Ab	491,07±468,15Bb	1832,06±316,57Aa
IR	303,88±115,07Ab	1459,92±247,24Aa	1316,07±376,82Aa

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas ($p \leq 0,05$).

Ao final do experimento, em todos os grupos foram observados aumentos significativos na concentração de GSH-px. Nos grupos AHm e IR esse aumento foi observado no T1 e se manteve no T2. No grupo AHmO3 houve uma tendência de aumento entre os tempos 0 e 1, mas sem diferença significativa entre eles, sendo observado acréscimo significativo no T2 (Fig.12). Esses resultados corroboram com os trabalhos realizados com oxigênio-ozonioterapia retal, mas não confirma que o agente responsável pelo aumento dessa enzima em tratamentos com sangue autólogo seja o O₃.

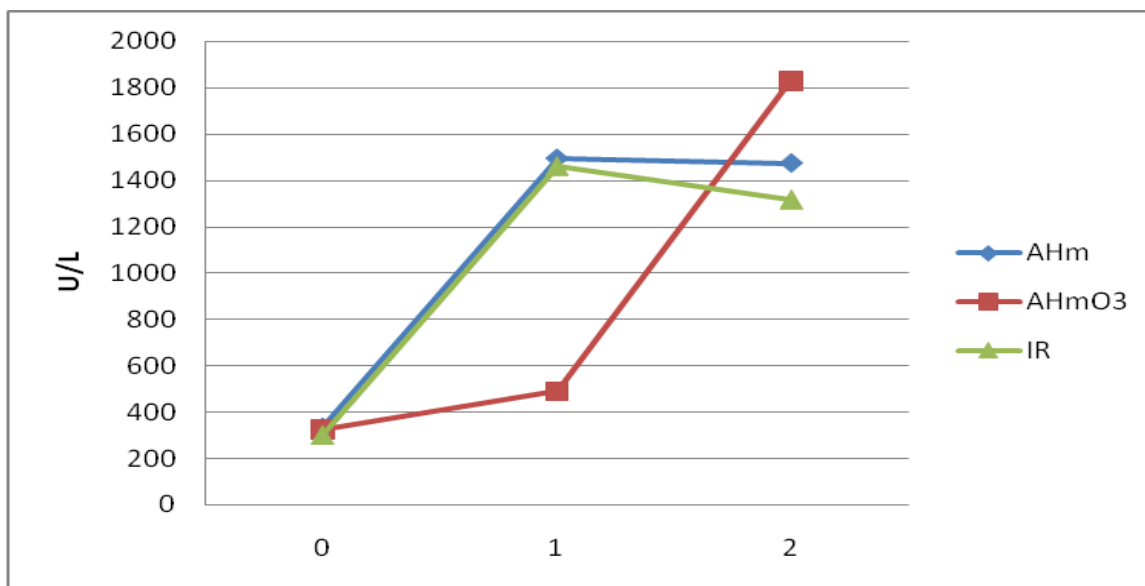


Fig.12: Concentração de Glutaciona peroxidase -GSH-Px (U/L) de cães hígdios submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

Dentre os metabólitos analisados estão incluídos ácido úrico, bilirrubina total, creatinina e uréia (Tab.8). Os valores de bilirrubina total apresentaram diferença significativa nos tempos zero e 1 entre o tratamento IR e os demais (Tab.7). A diferença significativa encontrada entre os tempos zero e 2 do grupo IR acompanhou a diminuição da lipemia nesses animais, o que justifica essa diferença. Provavelmente a causa dos valores acima do intervalo esteja relacionada a colestase observada na hiperlipidemia de um dos cães e a possibilidade de hemólise devido a

hemoparasitose diagnosticada no segundo cão, que apresentaram atividade de ALP acima dos intervalos para a espécie.

Não foram encontrados trabalhos que referenciem os valores de normalidade do ácido úrico para cães. Os uratos, no entanto, devem estar entre 20-120 mg/dL, segundo (Kaneko et al., 2000). Existem algumas evidências de que o ácido úrico tenha propriedades antioxidantes, agindo contra radicais livres no sangue (Glantzounis et al., 2005), diminuindo a concentração de radicais livres no soro de humanos saudáveis (Waring et al., 2001) e reduzindo o estresse oxidativo em atletas (Hellsten et al., 2001; Chevion et al., 2003; Waring et al., 2003). A única diferença estatística significativa observada para esta variável foi entre grupos no T2, onde animais do grupo IR apresentaram valores superiores aos demais.

lista

Tratamento	Zero	Tempos*	
		1	2
Ácido úrico (mg/dL)			
AHm	4,27±3,51Aa	11,11±11,68Aa	3,67±1,29ABa
AHmO3	7,49±11,58Aa	4,72±4,07Aa	3,20±2,52Ba
IR	9,47±6,94Aa	4,80±1,89Aa	11,89±7,90Aa
Bilirrubina total (mg/dL)- 0,1-0,5 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	0,38±0,16Ba	0,72±0,58ABa	0,21±0,12Aa
AHmO3	0,71±0,59Ba	0,41±0,13Ba	0,39±0,13Aa
IR	1,77±0,73Aa	1,94±3,28Aab	0,82±0,65Ab
Uréia (mg/dL)- 21-60 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	43,00±8,76Aa	42,39±15,62Aa	31,97±2,53Aa
AHmO3	38,93±7,55Aa	32,03±4,28ABa	36,47±10,21Aa
IR	40,29±10,73Aa	28,15±13,67Bb	36,71±13,66Aab
Creatinina (mg/dL)- 0,5-1,5 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	1,30±0,10Aa	1,25±0,17Aa	1,04±0,15Aa
AHmO3	1,31±0,25Aa	1,22±0,14Aa	1,16±0,19Aa
IR	1,21±0,52Aa	1,03±0,25Aab	0,92±0,21Ab

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas ($p \leq 0,05$).

Trabalho realizado por Chen et al., (2008) demonstrou efeito positivo nos valores de uréia e creatinina da aplicação retal profilática de O₃ em ratos posteriormente submetidos à processo de isquemia e reperfusão e Calunga et al., (2009) demonstraram o mesmo efeito benéfico, mas em aplicações após a indução de isquemia/reperfusão. Morsy et al., (2010) observaram diminuição de ambos analitos em animais diabéticos submetidos à oxigênio-ozonioterapia retal. Outros trabalhos (Demirbag et al., 2010; Morsy et al., 2010) também demonstraram redução significativa desses valores, mas a via utilizada foi a intraperitoneal. O mecanismo de ação do O₃ nesses casos não foi definido, mas acredita-se que ocorra diminuição do estresse oxidativo, melhora da função endotelial e redução da apoptose de células renais. No presente trabalho, nos grupos de tratamento com O₃ foi observada uma tendência a diminuição dos valores de uréia (Tab.8), com diferença significativa no T1 entre o grupo AHm e os grupos AHmO3 e IR. Dentro dos grupos com O₃ houve diferença significativa dos valores de uréia entre os tempos zero e 1 e da creatinina entre os tempos zero e 2 na aplicação retal (Fig.13 e Fig.14).

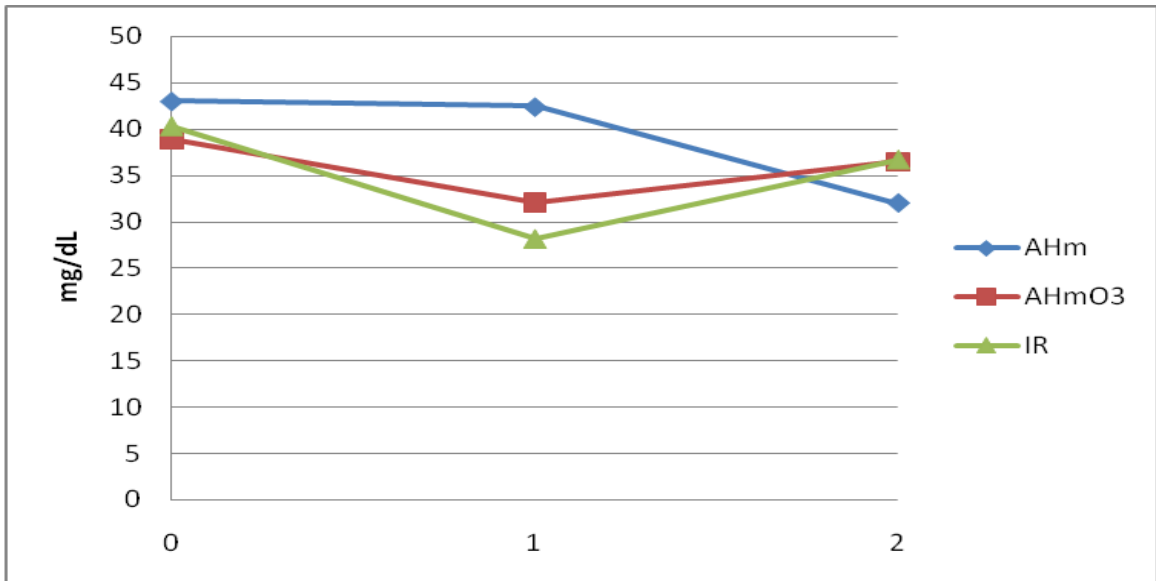


Fig.13: Concentração sérica de uréia (mg/dL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

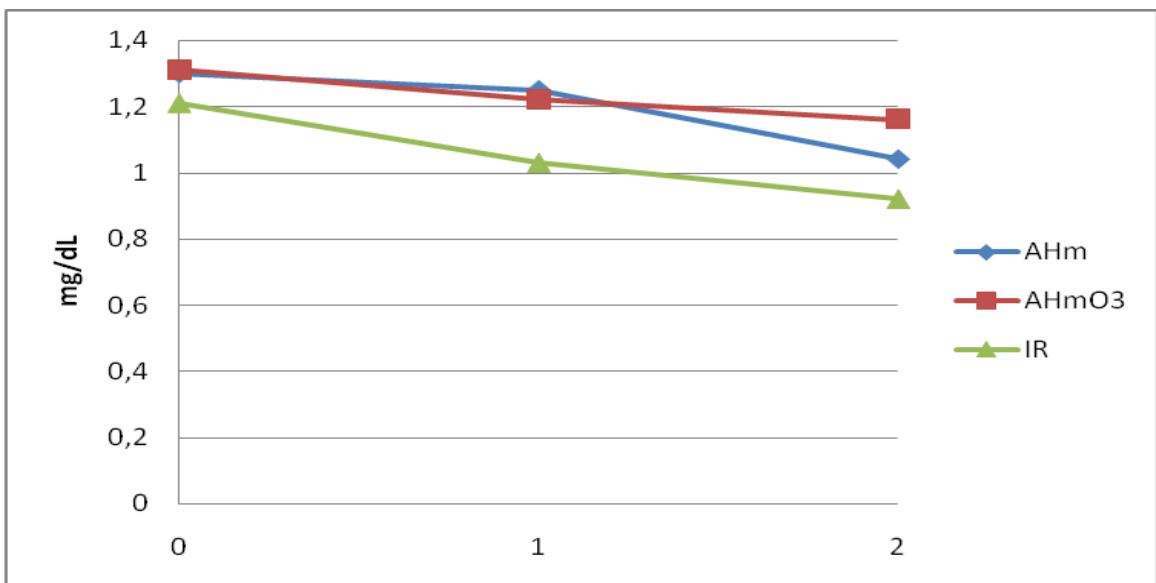


Fig.14: Concentração sérica de creatinina (mg/dL) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR), - antes do início do tratamento (T0), imediatamente antes da 6ª aplicação (T1) e 48h após a 10ª aplicação (T2).

A concentração de cálcio sérica depende do pH, da concentração de albumina e da relação ácido-base do indivíduo, sendo regulada por um forte controle endócrino desempenhado pelo paratormônio (PTH). Uma das causas de diminuição da absorção do cálcio no intestino é a quantidade de proteína na dieta, ou seja, dietas hipoproteicas causam diminuição da absorção de cálcio (González, 2000). Vários animais apresentaram hipocalcemia (Tab.9), se comparados os

resultados ao intervalo de referência para a espécie, provavelmente devido a interferência da dieta e homeostase inter minerais, o que não foi avaliado no presente estudo. Não houve diferença significativa entre grupos ou tempos, não havendo influência de nenhum dos tratamentos sobre esta variável.

Tabela 9: Valores médios seguidos do desvio padrão das concentrações de cálcio (mg/dL) e magnésio (mmol/L) de cães hígidos submetidos a auto-hemoterapia menor (AHm), auto-hemoterapia menor ozonizada (AHmO3) ou insuflação retal de ozônio (IR).

Tratamento	Tempos*		
	Zero	1	2
Cálcio (mg/dL)- 9,1-11,7 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	7,28±1,26Aa	9,00±0,55Aa	9,22±1,19Aa
AHmO3	8,36±0,63Aa	8,33±0,87Aa	10,93±6,86Aa
IR	8,37±1,05Aa	7,95±0,80Aa	9,10±0,76Aa
Magnésio (mmol/L)-1,6-2,4 (Kaneko et al., 2000)			
AHm	1,16±0,12Aa	1,29±0,13Aa	1,73±0,10Aa
AHmO3	1,36±0,24Aa	1,24±0,15Aa	1,59±0,64Aa
IR	1,22±0,22Ab	1,07±0,26Ab	1,88±0,46Aa

*Tempo zero- antes do início do tratamento, T1- imediatamente antes da 6ª aplicação; T2-48h após a 10ª aplicação. Letras maiúsculas comparam resultados dentro das colunas e minúsculas dentro das linhas ($p \leq 0,05$).

Com relação às concentrações de magnésio (Tab.9), foi observado aumento com diferença significativa apenas no tempo 2 do grupo IR. Os valores encontrados se mantiveram nos limites de referência e não foram diferentes daqueles obtidos no mesmo tempo dos outros tratamentos, o que pode indicar que essa diferença no tratamento IR não teria significado clínico. Como ocorreu aumento significativo apenas no grupo IR, podemos sugerir que a IR de O₃ facilitou a absorção intestinal de Mg, mas por mecanismo ainda desconhecido.

5. Conclusões

Nas condições em que este experimento foi realizado, pode-se concluir que:

- Oxigênio-ozonioterapia intra retal e auto-hemoterapia menor ozonizada alteram parâmetros eritrocitários em cães hígidos;
- O ozônio associado ao sangue em infusão intramuscular, reduz a concentração de monócitos e outros tipos celulares, sugerindo modulação do processo inflamatório inespecífico;
- A auto-hemoterapia não promove efeitos adversos em cães;
- A insuflação retal de ozônio, bem como a auto-hemoterapia menor ozonizada reduz as concentrações séricas de albumina, proteínas totais e triglicerídeos em cães hígidos;
- Aplicações de ozônio retal, intramuscular associado a sangue autólogo, ou apenas a aplicação de sangue autólogo por via intramuscular, causam aumento dos níveis de GSH-Px;
- A insuflação retal de ozônio altera mais parâmetros bioquímicos que a administração de sangue autólogo ozonizado.

6. Referências bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Saunders, 2011. 592p.

ABOZ. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONIOTERAPIA. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em www.aboz.org.br. Acesso em: 23 mar. 2013.

AL-DALAIN, S.M.; MARTINEZ, G.; CANDELARIO-JALIL, E et al.,). Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol. Res.*, v.44, n. 5, p. 391-6, 2001.

AL-HEGELAN, M.; TIGHE, R.M.; CASTILLO, C. et al., Ambient ozone and pulmonary innate immunity. *Immunol. Res.*, v. 49, n. 1-3, 173-91, 2011.

ALMAZ, M.E.; SONMEZ, I.S. "Ozone therapy in the management and prevention of caries." *J Formos Med Assoc.*, v. 114, n. 1, p. 3-11, 2013.

ANDERSEN, C.; TORVUND-JENSEN, M.; NIELSEN, M. et al., Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex. *Nature*, v.489, n.7416, p.456-459, 2012.

ANRAKU, M.; YAMASAKI, K.; MARUYAMA, T. et al., Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharmaceu. Res.*, v.18, n.5, p.632-639, 2001.

ARAI, T.; INOUE, A.; UEMATSU, Y.; et al., Activities of enzymes in the malate-aspartate shuttle and the isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase in plasma and peripheral leukocytes of lactating Holstein cows and riding horses. *Res.Vet. Sci.*, v.75, p.15-19, 2003.

ARSALANE, K.; GOSSET, P.; VANHEE, D. et al., Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.13, p.60-68, 1995.

ASLAN, M.K.; BOYBEYI, O.; SENYUCCEL, M.F. et al., Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury. *J. Pediatr. Surg.*, v. 47, n. 9, p, 1730-4, 2012.

AUBOURG, P. Ozon in der chirurgie. *Mem. Acad. Chir.*, v.65, p.1183-1192, 1940.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin.Investig.*, v.52, p.741-744, 1973.

BAKKAL, B.H.; GULTEKIN, F.A.; GUVEN, B. et al., Effect of ozone oxidative preconditioning in preventing early radiation-induced lung injury in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 46, n.9, p. 789-96, 2013.

- BANSAL, P.; WANG, Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.295, 2008.
- BARBER, E.; MENENDEZ, S.; LEON, O.S. et al., Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators Inflamm.* v. 8, n.1, p. 37-41, 1999.
- BARGER, A.M. The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. *Vet. Clin. Small Anim.*, v.33, p.1207-1222, 2003.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím.Nova*, v. 29(1), p. 113-123, 2006.
- BARTGES, J.W. Distúrbios dos túbulos renais.. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C.. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doença do Cão e do Gato*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. V. 2, cap. 174, p. 1795-1801.
- BATEMAN, R.; SHARPE, M.; ELLIS, C. Bench-to-bedside review: Microvascular dysfunction in sepsis –hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Critical Care*, v.7n.5, p.359-373, 2003.
- BEEVI, S.S.S.; RASHEED, A.M.H.; GEETHA, A. Evaluation of oxidative stress and nitric oxide levels in patients with oral cavity cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, v. 34, p. 379–385, 2004.
- BERTOLUCCI, C.; FAZIO, F.; PICCIONE, G. Daily rhythms of serum lipids in dogs: influences of lighting and fasting cycles. *Comp. Med.*, v.58, n.5, p.485-9, 2008.
- BOCCI, V(a). Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, v. 10, p. 31-53, 1996
- BOCCI, V(b). Does Ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for the therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med. Hypotheses*, v. 46, p. 150-154, 1996.
- BOCCI, V. *Oxygen-Ozone Therapy*. A critical evaluation. Kluwer Academic: Dordrecht, 2002.
- BOCCI, V. (a) Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation*, n. 13, v.1, p.3-11, 2004.
- BOCCI, V. (b) Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of art. *Riv. Itali. Ossigeno-ozonoterapia*, v. 5, p. 93-104, 2004.
- BOCCI, V. *Ozone: A new medical drug*. Dordrecht: Springer, 2005.
- BOCCI, V. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch. Med. Res.*, v. 37, p. 425-435, 2006.
- BOCCI, V.; PAULESU, L. Studies on biological effects of ozone: 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica*, v. 75, p.510-515, 1990.

- BOCCI, V.; LUZZI, E.; CORRADESCHI, F. et al., Studies on biological effects of ozone: 3. An attempt to define conditions for optimal induction of cytokines. *Lymphokine Cytokine Res.* v. 12, p.121-126, 1993.
- BOCCI, V.; VALLACHI, G.; CORRADESCHI, F. et al., Studies on biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediat Inflamm*, v.7, p.313-317, 1998.
- BOCCI, V.; VALACCHI, G.; ROSSI, R. et al., Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. *Platelets*, v.10, p.110-116, 1999.
- BOCCI, V.; LARINI, A.; MICHELI, V. Restoration of normoxia by ozone therapy may control neoplastic growth: a review and a working hypothesis. *J. Altern. Complem. Med.*, v. 11, p. 257-265, 2005.
- BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J. Transl.Med*, v.9, n.66, 2011.
- BOCCI, V.; ZANARDI, I.; BORRELLI, E. et al., Reliable and effective oxygen-ozone therapy at a crossroads with ozonated saline infusion and ozone rectal insufflation. *J. Pharm. Pharmacol.*, n.64, p. 482-489, 2012.
- BOND, M.; VADASZ, G.; SOMLYO, A.V. et al., Subcellular calcium and magnesium mobilization in rat liver stimulated in vivo with vasopressin and glucagon. *J. Biol. Chem.*, 1987. Disponível em <<http://www.jbc.org/content/262/32/15630.short>> Acesso em 15 de Março de 2015.
- BORRELLI, E.; DIADORI, A.; ZALAFFI, A. et al., Effects of major ozonated autohemotherapy in the treatment of dry age related macular degeneration: a randomized controlled clinical study. *Int. J. Ophthalmol.* v. 5, n.6, p.708-13, 2012.
- BOSSA-MIRANDA, M.A.; VALENCIA-CELIS, V. del C.; CARVAJAL-GIRALDO, B.A.; et al. Automated hemogram values for healthy dogs aged 1 to 6 years attended at the Veterinary Hospital Universidad de Antioquia (Colombia), 2002-2009. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.*,v.25, p.409-416, 2012.
- BRAUN, J.; LEFEBVRE, H.; WATSON, A. Creatinine in the dog: a review. *Vet. Clin. Path.*, v.32, n.4, p.162-179, 2003.
- CALUNGA, J.; TRUJILLO, Y.; MENÉNDEZ, S. et al. Ozone oxidative post-conditioning in acute renal failure. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.61, p. 221-227, 2009.
- CAÓ, M.A. *Autohemoterapia em ratos (Rattus norvegicus)*: Efeito sobre o nível do fator de necrose tumoral (TNF- α) e leucócitos. 2013. 40f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.
- CARTER, D.C.; HO, J.X. Structure os serum albumin. *Adv. Protein. Chem.*, v.45, p.153-203, 1994.

CENTER, S. A. Interpretation of liver enzymes. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, v.37, p. 297–333, 2007.

CERCHIARI, E.L.; HOEL, T.M.;SAFAR, P. Protective effects of combined superoxide dismutase and deferoxamine on recovery of cerebral blood flow and function after cardiac arrest in dogs. *Stroke*, v.18, n.5, p.868-878, 1987.

CHEN, H.; XING, B.; LIU, X. et al., Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. *J. Surg. Res.*, v.149, n.2., p.287-95, 2008.

CHEVION, S.; MORAN, D.S.; HELED, Y.; et al., Plasma antioxidant status and cell injury after physical exercise. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, v.100, p.5119-23, 2003.

CHRISTODOULOU, J.; SADLER, P. J.; TUCKER, A. A new structural transition of serum albumin dependent on the state of Cys34. Detection by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, v.225, p. 363–8, 1994.

CHURCH, S.L.; GRANT, J.W.; RIDNOUR, L.A. et al Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, p.3113-3117, 1993.

COOPER, E.S.; WELLMAN, M.L.; CARSILLO, M. E. Hyperalbuminemia associated with hepatocellular carcinoma in a dog. *Vet. Clin. Pathol.*, v.38, p.516–20, 2009.

CORKEY, B.E.; DUSZYNSKI, J.; RICH, T.L. et al., Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 1986.

DA SILVA, L. A. F.; JAYME, V. S.; OLIVEIRA, M. A B. et al. Papilomas cutâneos e auto-hemoterapia no tratamento da papilomatose bovina. *Vet. Not.*, v. 4, n. 1, 1998.

DE MARCHI, E.; BALDASSARI, F.; BONONI, A. et al., Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013: 564961.

DEMIRBAG, S.; UYSAL, B.; GUVEN, A. et al., Effects of medical ozone therapy on acetaminophen-induced nephrotoxicity in rats. *Renal failure*, v.32, n.4, p.493-7, 2010.

DIAL, S. M. Clinicopathologic evaluation of the liver. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, v. 25, p. 257–73, 1995.

DRUMOND, K. O.; QUESSADA, A. M.; SILVA, S. M. M. S.; et al. Transmissible venereal tumor treated with autohemotherapy. *Acta Sci. Vet.*, v. 41, 2013.

ELROUF, M.; AMANULLAH, M.; ZAMAN, G. Interference of hemolysis in the estimation of plasma aspartate amino transferase (AST), potassium and phosphate. *J. Invest. Biochem.*, v.1, p. 12-16, 2013.

ESCODRO, P.B.; JOAQUIM, J.G.F.; MARIZ, T.M.A. et al. Autohemotherapy at acupuncture points post orchiectomy surgery in cart horses- Eight cases report. *Vet. Zootec.*, v.19, n.4, p. 502-506, 2012.

FAGAN, T.E.; ROMANI, A. Activation of Na⁺-and Ca²⁺-dependent Mg²⁺ extrusion by α 1- and β -adrenergic agonists in rat liver cells. *Am. J. Physiol.*, 2000. Disponível em <<http://ajpgi.physiology.org/content/279/5/G943.short>> Acesso em 15 de Março de 2015.

FAIRBANKS, V.F.; ZIESMER, S.C.; O'BRIEN, P.C. Methods for Measuring Plasma Hemoglobin in Micromolar Concentration Compared. *Clin. Chem.*, v.38, n.1, p.132-140, 1992.

FAYOS, M.; COUTO, C. G.; IAZBIK, M. C.; WELLMAN, M. L. Serum protein electrophoresis in retired racing Greyhounds. *Vet. Clin. Path.* 34, 397 – 400, 2005.

FATHOLAH, M.; LANOUE, K.; ROMANI, A. et al. Relationship between total and free cellular Mg²⁺ during metabolic stimulation of rat cardiac myocytes and perfused hearts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000.

FELICE, L.J.; DOMBROVSKIS, D.; LAFOND, E. et al., Determination of uric acid in canine serum and urine by high performance liquid chromatography. *Vet. Clin. Pathol.*, v.19, p. 86-9, 1990.

FERNANDEZ, N.J.; KIDNEY, B.A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Vet. Clin. Path.*, v.36, n.3, p.223-33, 2007.

FERNÁNDEZ IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ NÚÑEZ, L.; CALUNGA FERNÁNDEZ, J. et al. Ozone postconditioning in renal ischaemia-reperfusion model. Functional and morphological evidences. *Nefrologia*. v. 31, v.4, p. 464-70, 2011.

FIGGE, J.; ROSSING, T.H.; FENCL, V. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J. Lab. Clin. Med.* v. 117, p. 453-467, 1991.

FINCO, D.R.; BROWN, S.A.; VADEN, S.L. et al., Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration rate in dogs. *J. Vet. Pharm. Therap.*, v.18, p.418-421, 1995.

FOGLIENI, C.; FULGENZI, A.; BELLONI, D. et al., Ozonated autohemotherapy: protection of kidneys from ischemia in rats subjected to unilateral nephrectomy. *BMC Nephrol.*, v.12, n.61, 2011.

FUJIMAKI, H., OZAWA, M., SHIMIZU, F. Effect of short-term exposure to O₃, on antibody response in mice. *Environ. Res.*, v. 35, p. 490-496, 1984.

FUKUI, Y.; SATO, J.; YASUDA, J. et al., Canine serum thermostable alkaline phosphatase isoenzyme from a dog with hepatocellular carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.*, v.68, p. 1129-1132, 2006.

GIZI, A.; PAPASSOTIRIOU, I.; APOSTOLAKOU, F. et al., Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood cells Mol. Dis.*, v.46, n.3, p.220-5, 2011.

GLANTZOUNIS, G.K.; TSIMOYIANNIS, E.C.; KAPPAS, A.M. et al., Uric acid and oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.*, v.11, p.4144-51, 2005.

GOLDMAN, M. Cancer risk of low-level exposure. *Science*, v. 271, n.5257, p.1821-1822, 1996.

GOMES-MARCONDES, M.; TISDALE, M. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.*, v.180, n.1, p.69-74, 2002.

GÓMEZ SELGAS, A.; BEXFIELD, N.; SCASE, T. J. et al. Total serum bilirubin as a negative prognostic factor in idiopathic canine chronic hepatitis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 26, p. 246-51, 2014.

GONZÁLEZ, F.H.D; Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: González F.H.D. et al. (Ed). Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, Brasil. Gráfica da UFRGS. 2000. 106p.

GONZÁLEZ, F.H.D; CARVALHO, V.; MÖLLER, V.A.; et al. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 29, n.1, p.1-6, 2001.

GUL, H.; UYSAL, B.; CAKIR, E. et al. The protective effects of ozone therapy in a rat model of acetaminophen-induced liver injury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 35, n. 1, p. 81-6, 2012.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, brain iron and degeneration: Basic principles. In: OLANOW, C.; JENNER, P.; YODIM, M. *Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease*. Londres: Academic Press, 1996. p. 2-21.

GUVEN, A.; GUNDOGDU, G.; SADIR, S. et al. The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn. *J. Pediatr. Surg.*, v.43, n. 9, p.1679-84, 2008.

GUVEN, A.; GUNDOGDU, G.; VURUCU, S. et al. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *J. Pediatr. Surg.*, v. 44, n. 9, p. 1730-5, 2009.

HALBAUER, K.; PRSKALO, K.; JANKOVIC, B. et al., Efficacy of ozone on microorganisms in the tooth root canal. *Coll Antropol*, v. 37, n.1, p.101-7, 2013.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanisms and measurement in mammalian systems. *FEBS*, v. 281(1,2), p. 9-19, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* v.280, n.1, p.1-8, 1990.

HALONEN, J.I.; LANKI, T.; TIITTANEN, P. et al. Ozone and cause-specific cardiorespiratory morbidity and mortality. *J. Epidemiol. Community Health*, v. 64, n.9, p.814-20, 2010.

HELLSTEN, Y.; SVENSSON, M.; SODIN, B.; et al. Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, v.31, p.1313-22, 2001.

HENSLER, S.; GUENDLING, P. W.; SCHMIDT, M.; JORK, K. Autologous blood therapy for common cold – A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Complement. Ther. Med.*, v. 17, p. 257-261, 2009.

HERNÁNDEZ, F.; MENÉNDEZ, S.; WONG, R. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. *Free Radical Bio. Med.*, v.19, n.1, 1995.

HERNÁNDEZ, F. A. To what extent does ozone therapy need a real biochemical control system? Assessment and importance of oxidative stress. *Arch Med Res*, v. 38, p. 571-578, 2007.

HESTA, M; OTTERMANS, C.; KRAMMER-LUKAS, S. et al. The effect of vitamin C supplementation in healthy dogs on antioxidative capacity and immune parameters. *J. Anim. Physiol. An. N.*, v.93, n.1, p.26-34, 2009.

HILL, J.M.; LEISEWITZ, A.L.; GODDARD, A. The utility of uric acid assay in dogs as an indicator of functional hepatic mass. *Jl. S.Afr.Vet.Ass.*, v.82, n.2, p.86-93, 2011.

HORTON, A.A.; FAIRHURST, S. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* v.18, p. 27-79, 1987.

HOSOYA, K.; LORD, L.K.; LARA-GARCIA, A. et al. Prevalence of elevated alanine transaminase activity in dogs treated with CCNU (Lomustine)*. *Vet. Comp. Oncol.*, v.7, n.4, 2009.

HUMMEL, S.G.; FISCHER, A.J.; MARTIN, S.M. et al. Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. *Free Radiol. Biol. Med.*, v. 40, p. 501–506, 2006.

ISCO3. International Scientific Committee of Ozonotherapy. *Declaração de Madrid sobre ozonioterapia*. Madrid, 2010. 23p. Disponível em : <http://www.aepromo.org/declaracion_madrid/Portuguese_declaration.pdf>. Acesso em 24 mar. 2013.

JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. 417p.

JAKAB, G. J.; SPANNHAKE, E. W.; CANNING, B. J. et al. The effects of ozone on immune system. *Environ Health Perspect.*, v.103(2), p.77-89, 1995.

JANGI, S.; OTTERBEIN, L.; ROBSON, S. The molecular basis for the immunomodulatory activities of unconjugated bilirubin. *Int. J. Biochem. Cell.Biol.*, v.45, n.12, 2013.

JORENS, P. G.; MATTHYS, K. E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators of Inflammation*, v. 4, p. 75-89, 1995

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, v.107, n.6, p.2279-85, 2006.

KAWASUMI, K.; SUZUKI, T.; FUJIWARA, M. et al. New criteria for canine metabolic syndrome in Japan. *J. Anim. Vet.*, 2012. Disponível em <<http://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2012.4005.4007>> Acesso em 15 de Março de 2015.

KAWASUMI, K.; KASHIWADO, N.; OKADA, Y. et al. Age effects on plasma cholesterol and triglyceride profiles and metabolite concentrations in dogs. *BMC Vet. Res.*, v.10, n.57, 2014.

KHATRI, S.B.; HOLGUIN, F.C.; RYAN, P.B. et al. Association of ambient ozone exposure with airway inflammation and allergy in adults with asthma. *J. Asthma*, v. 46, n.8, p.777-85, 2009.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. *Kuby Immunology*. 6. Ed. Nova York: W. H. Freeman, 2007. 574 p.

KRUGER, J.M.; OSBORNE, C.A. Etio- pathogenesis of uric acid and ammonium urate uroliths in non-Dalmatian dogs. *Vet. Clin. N. Am.-Small*, v.16, n.87, p.87-126, 1986.

KUNDUR, A. R.; SINGH, I.; BULMER, A. C. Bilirubin, platelet activation and heart disease: A missing link to cardiovascular protection in Gilbert's syndrome? *Atherosclerosis*, v.239, p.73-84, 2015.

LEON, O.S.; MENENDEZ. S.; MERINO, N. et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm*, v. 7, n. 4, p. 289-94, 1998

LEON FERNANDEZ, O.S.; AJAMIEH, H.H.; BERLANGA, J. et al. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. *Transpl. Int.*, v.21, n.1, p.39-48, 2008.

LEONEL, C.; GELALETI, G.B.; JARDIM, B.V.; et al Expression of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase pi in canine mammary tumors. *BMC Vet. Res.*, v.10, n.49, 2014.

LEVEILLE-WEBSTER, C.R. Diagnóstico laboratorial de doenças hepatobiliares. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C.. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doença do Cão e do Gato*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. V. 2, cap. 141, p. 1348-1364.

LI, Z.; POTTS-KANT, E.N.; GARANTZIOTIS, S. et al, Hyaluronan signaling during ozone-induced lung injury requires TLR4, MyD88, and TIRAP. *PLoS One*, v.6, n.11, 2011.

LI, Z.; TIGHE, R.M.; FENG, F. et al. Genes of innate immunity and the biological response to inhaled ozone. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, v. 27, n.1, p. 3-16, 2013.

- LIN, Q.; CHEN, H.; LU, C. et al. Effects of ozone on sciatic nerve in rat. *Interv. Neuroradiol.*, v. 17, n. 3, p. 281-5, 2011.
- LOPES, C.; CARREGARO, A.B.; FREITAS, G.C; et al. Effect of tepoxalin on renal function and hepatic enzymes in dogs exposed to hypotension with isoflurane. *Vet. Anaesth. Analg.*, v.41, n.5, p.459-67, 2014.
- MADEJ, P.; PLEWKA, A.; MADEJ, J.A. et al. Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. *Inflammation*, v. 30, n. 1-2, p. 52-8, 2007."
- MARGALIT,M.;ATTIAS,E.; ATTIAS,D. et al. Effect of ozone on neutrophil function in vitro. *Clin Lab Haem*, v.23, p. 243-247, 2001.
- MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, v.17, n.1,2003.
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; AL-DALAIN, S.; MENÉNDEZ, S. et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur. J. Pharm.*, v.523, n.1-3, 2005.
- MCCORD, J.M.; EDEAS, M.A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed. Pharmacother.*, v.59, p.139–142, 2005.
- METTENLEITER, M. W. Autohemotransfusion in preventing postoperative lung complications. *Am. J. Surg.*, v.32, n. 2. P. 321-323, 1936.
- METZ, R. Behandlung einer multiplen Diskopathie mit Ozon-Sauerstoff-Therapie. *Z. Ganz. Tierm.*, v.24, n.1-3, 2010.
- MILNE, E.M.; DOXEY, D.L. Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the tissues and sera of clinically normal dogs. *Res. Vet. Sci.*,v.43, p.222–4, 1987.
- MIYAZAKI, M.; ROSENBLUM, J. S.; KASAHARA, Y. et al. Determination of enzymatic source of alanine aminotransferase activity in serum from dogs with liver injury. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 60, p.307–15, 2009.
- MONTEIRO, V. C. B. *Avaliação do estresse oxidativo em humanos e em animais suplementados com ácidos graxos polinsaturados Omega3*. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MORSY, M.; HASSAN, W.; ZALAT, S. Improvement of renal oxidative stress markers after ozone administration in diabetic nephropathy in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.*, v.2, n.29, 2010.
- MORI, N.; LEE, P.; MURANAKA, S. et al. Predisposition for primary hyperlipidemia in Miniature Schnauzers and Shetland sheepdogs as compared to other canine breeds. *Res.Vet. Sci.*, v.88, n.3, p.394-9, 2010.
- MORI, N.; LEE, P.; KONDO, K. et al. Potential use of cholesterol lipoprotein profile to confirm obesity status in dogs. *Vet.Res. Comm.*, v. 35, n.4, p.223-35, 2011.

- MUDWAY, I.S.; KELLY, F.J. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Mol. Aspects Med.*, v. 21, n.1-2, p. 1-48, 2000.
- MUSANTE, L.; BRUSCHI, M.; CANDIANO, G. et al. Characterization of oxidation end product of plasma albumin "in vivo". *Biochem. Bioph. Res. Co.*, v.349, n.2, p.668-73, 2006.
- NAGABABU, E.; CHREST, F.J.; RIFKIND, J.M. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys.*, v.1620, n.1-3, p.211-7, 2003.
- NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.*, v.13, n.5, p.349-61, 2013.
- NEUZIL, J.; STOCKER, R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipo-protein lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, v.269, n. 24, 1994.
- SIAH, N.; DZOGBEFIA, V.P.; ANSONG, D. et al. Pattern of AST and ALT Changes in Relation to Hemolysis in Sickle Cell Disease. *CMBD*, 1, 2011.
- OETTL, K.; STAUBER, R.E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br. J. Pharmacol.*, v.151, n.5, p.580-90, 2007.
- OETTL, K.; STADLBAUER, V.; PETTER, F. et al Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *BBA - Mol. Basis Dis.*, v. 1782, p. 469–473, 2008.
- O'CONNELL, T.X.; HORITA, T.J.; KASRAVI, B. Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. *Am. Fam. Physician*, v. 71, n.1, p. 105 – 112, 2005.
- OLWIN, J. H.; RATAJCZAK, H. V.; HOUSE, R. V. Successful treatment of herpetic infections by autohemotherapy. *J. Altern. Complement. Med.*, v. 3, n. 2, p. 155-158, 1997.
- OMOBOWALE, T.O.; OYAGBEMI, A.A.; AKINRINDE, A.S.; et al. Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats. *Environ. Toxicol. Pharm.*, v.37, n.3, p.1202-11, 2014.
- OTAGIRI, M.; CHUANG, V.T. Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, v.32, n.4, p.527-34, 2009.
- PARADYSZ, A.; HYLA-KLEKOT, L.; WIELICKI, Y. Studies on the behavior of some immunologic parameters after local, endoscopic autohemotherapy in children treated for vesiculourethral reflux. *Wiad Lek*, v. 51, n. 3, p. 114-119, 1998.
- PASTERNAK, K.; KOCOT, J.; HORECKA, A. Biochemistry of magnesium. *J. Elem.*, 2010. Disponível em <<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-6b729033-5c5f-47de-b586-ddbd4057818f>>. Acesso em 23 de Março de 2015.

- PETERS, T.J. *All about albumin—Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1996.
- PRESSLER, B.M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. *Vet. Clin. N. Am. - Small*, v.43, n.6, p.1193-208, 2013.
- REITER, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB journal*, 1995). Disponível em <<http://www.fasebj.org/content/9/7/526>>. Acesso em 05 de Março, 2015.
- RIFKIND, L.; ZHANG, A.; LEVY, P.T. The hypoxic stress on erythrocytes associated with superoxide formation. *Free Radic. Res. Commun.*, v. 12, n.13, p. 645-652, 1991.
- RIFKIND, J.; MOHANTY, J.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Front Physiol*, v. 5, n. 500, 2015.
- ROCHE., M.; RONDEAU, P.; SINGH, N.R.; TARNUS, E. et al. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters*, v.582, n.13, p.1783-7, 2008.
- RONDEAU, P.; ARMENTA, S.; CAILLENS, H. et al. Assessment of temperature effects on beta-aggregation of native and glycosylated albumin by FTIR spectroscopy and PAGE: relations between structural changes and antioxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.460, n.1, p.141-150, 2007.
- RODEKOHR, S.; KÜBLER, H. *Grundlagenseminar Ozontherapie bei Tieren 2009*. Nürnberg: *9.Internationaler Kongress für Ganzheitliche Tiermedizin*, p. 1–75.
- ROMANI, A.; MATTHEWS, V.D.; SCARPA, A. Parallel stimulation of glucose and Mg²⁺ accumulation by insulin in rat hearts and cardiac ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 2000.
- ROSAS-DÍAZ, M.; CAMARILLO-CADENA, M.; HERNÁNDEZ-ARANA, A. et al. Antioxidant capacity and structural changes of human serum albumin from patients in advanced stages of diabetic nephropathy and the effect of the dialysis. *Mol. Cell. Biochem.*, 2015.
- ROTHUIZEN, J.; VAN DEN BROM, W.E.; FEVERY, J. The origins and kinetics of bilirubin in healthy dogs, in comparison with man. *J. Hepatol.*, v.15, p.25-34, 1992.
- SAGAI, M., BOCCI, V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med. Gas Res.* v. 1, n. 29, 2011.
- SALIN, M.L.; MCCORD, J.M. Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J. Clin. Investig.*, v.56, p.1319-1323, 1975.
- SANECKI, R.K.; HOFFMANN, W.E.; HANSEN, R. et al. Quantification of bone alkaline phosphatase in canine serum. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 22, p. 17-23, 1993.
- SCHIRMER, K. P.; FRITZ, M.; JÄCKEL, W. H. Wirksamkeit von Formica rufa und Eigenblut-Injektionen bei Patienten mit ankylosierender Spondylitis: eine doppelblinde, randomisierte Studie. *Z. Rheumatol.*, v. 59, p. 321-329, 2000.

- SCHULZ, S.; RODRIGUEZ, Z.Z.; MUTTERS, R. et al. Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in lethal polymicrobial sepsis in rats. *Eur. Surg. Res.*, v. 35, n. 1, p. 26-34, 2003.
- SCOTT, M.D.; EATON, J.W.; KUYPERS, F.A. et al. Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: Effects on cellular oxidant defense. *Blood*, v.74, n.7, p. 2542-2549, 1989.
- SEIDLER, V.; LINETSKIY, I.; HUBALKOVA, H. et al. Ozone and its usage in general medicine and dentistrz. A review article. *Prague Med. Rep.*, v. 109(1), p. 5-13, 2008.
- SHAH, P.; SHYAM, A.K.; SHAH, S. Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia. *Indian J. Orthop.*, v. 45, n.4, p.376-9, 2011.
- SHILPA REDDY, A.; REDDY, N.; DINAPADU, S. et al. Role of ozone therapy in minimal intervention dentistry and endodontics - a review. *J. Int. Oral Health*, v. 5, p.3, p. 102-8, 2013.
- SHINRIKI, N.; SUZUKI, T.; TAKAMA, K. et al. Susceptibilities of plasma antioxidants and erythrocyte constituents to low levels of ozone. *Haematologia*, v.29, p.229-239, 1998.
- STOCKHAM, STEVEN L., SCOTT, MICHAEL A. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Blackwell Publishing, 2008.
- STOWE, H.; LAWLER, D.; KEALY, R. Antioxidant status of pair-fed labrador retrievers is affected by diet restriction and aging. *J. Nutr.*, v. 136, n. 7, p. 1844-8, 2006.
- STRAZZULLO, A.; PUIG, J.G. Uric acid and oxidative stress: Relative impact on cardiovascular risk. *Nut. Metab. Cardiovas.*, v.17, p.409-414, 2007.
- SUH, S.H.H.; PAIK, I.Y.Y.; JACOBS, K.. Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. *Mol. Cells*, v.23, n.3, p.272-9, 2007.
- SYAKALIMA, M.; TAKIGUCHI, M.; YASUDA, J. et al. The age dependent levels of serum ALP isoenzymes and the diagnostic significance of corticosteroid-induced ALP during long-term glucocorticoid treatment. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 59, p. 905-909, 1997.
- TABBARA, I.A. Hemolytic anemias. Diagnosis and management. *Med. Clin. North Am.* v.76, p.649- 668, 1992.
- TASDEMIR, C.; TASDEMIR, S.; VARDI, N. et al. Evaluation of the effects of ozone therapy on Escherichia coli- induced cytitis in rat. *Ir. J. Med. Sci.*, v.182, n.4, p.557-63, 2013.
- TAVERNA, M.; MARIE, A-LL.; MIRA, J-PP. et al. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann. Intensive care*, v.3, n.1, 2013.
- THORENS, B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes. Metab.*, v.13, n.1, p.82-8, 2011.
- TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, v. 22, p.7369-75, 2003.

- TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; BOCCI, V. A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. *International Journal of Macromolecules*, v.39, p.317-320, 2006.
- TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; SILVIETTI, A. et al A physiochemical investigation on the effects of ozone on blood. *International Journal of Macromolecule*, v.41, p.504-511, 2007.
- TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J.J.; HOLDEN, S.L. et al. Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: a comparison with human metabolic syndrome. *BMC veterinary research*, v.8, n.147, 2012.
- USUI, S.; MIZOGUCHI, Y.; YASUDA, H. et al. Dog age and breeds associated with high plasma cholesterol and triglyceride concentrations. *J. Vet. Med. Sci.*, v.76, n.269–72, 2014.
- UYSAL, B.; DEMIRBAG, S.; POYRAZOGLU, Y. et al. Medical ozone therapy decreases postoperative uterine adhesion formation in rats. *Arch. Gynecol. Obstet.*, v. 286, n. 5, p. 1201-7, 2012.
- VAILLANT, J.D.; FRAGA, A.; DIAZ, M.T. et al. Ozone oxidative postconditioning ameliorates joint damage and decreases pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress in PG/PS- induced arthritis in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 714, n.1-3, p.318-24, 2013.
- VALACCHI,G.; BOCCI,V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators of Inflamm.*,v. 8, p. 205-209, 1999.
- VAN HOOFF, H.J.M.; ZIJLSTRA, F.J. VOSS, H-P. et al. The effect of ozone exposure on the release of eicosanoids in guinea-pig BAL fluid in relation to cellular damage and inflammation. *Mediat. Inflamm.*, v.6, p.355-361, 1997.
- VARSHNEY, A.; REHAN, M.; SUBBARAO, N. et al. Elimination of Endogenous Toxin, Creatinine from Blood Plasma Depends on Albumin Conformation: Site Specific Uremic Toxicity & Impaired Drug Binding. *PLoS ONE*, v.6, n.2, 2011.
- VIEBAHN-HÄNSLER, R.; FERNÁNDEZ, O. S. L.; FAHMY, Z. Ozone in medicine: the low dose ozone concept – guidelines and treatment strategies. *Ozone-Sci .Eng.* v. 34, n. 6, p. 408-424, 2012.
- VOMA, C.; BARFELL, A.; CRONIGER, C. et al. Reduced cellular Mg²⁺ content enhances hexose 6-phosphate dehydrogenase activity and expression in HepG2 and HL-60 cells. *Arch. Biochem.Biophys.*, v.548, p.11-9, 2014.
- VOLKHOVSKAYA, N.B.; TKACHENKO, S.S.; BELOPOLSKY, A.A. Modulation of phagocytic activity of blood polynuclear leucocytes with ozonated physiological saline. *Bull Exp Biol Med*, v.146, n.5, p.559-561, 2008.
- WALTER, P.; FUNG, E.; KILLILEA, D. et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β-thalassaemia or sickle cell disease. *Br. J. Haematol.*, v. 135, p. 254–263, 2006.

WALTER, E.L.; SPRENG, D.; SCHMÖCKEL, H. et al. Distribution of lactate dehydrogenase in healthy and degenerative canine stifle joint cartilage. *Histochem. Cell Biol.*, v.128, n.1, p.7-18, 2007.

WARING, W.S.; CONVERY, A.; MISHRA, V. et al. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin. Sci.*, 2003. Disponível em: <<http://www.clinsci.org/cs/105/cs1050425.htm>> Acesso em 15 de Março de 2015.

WARING, W.S.; WEBB, D.J; MAXWELL, S.R. Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.38, p.365-71, 2001.

WASHIZU, T.; NAKAMURA, M.; IZAWA, N. et al. The activity ratio of the cytosolic MDH/LDH and the isoenzyme pattern of LDH in the peripheral leukocytes of dogs, cats and rabbits. *Vet. Res. Comm.*, v.26, p.341-346, 2002.

WASSERMAN, D.H. Four grams of glucose. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* v. 296, 2009.

WOLFF, H.H. Die Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Ozon. *Erfahr HK*, v.23, p.181-184, 1974.

ZAKY, S.; FOUAD, E.; KOTB, H. The effect of rectal ozone on the portal vein oxygenation and pharmacokinetics of propranolol in liver cirrhosis (a preliminary human study). *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2011.

ZAMORA, Z. B.; BORREGO, A.; LÓPEZ, O. Y. et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF- α release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm.*, v. 2005:1, p. 16-22, 2005.

ZIMRAN A., WASSER G. & FORMAN L. et al. Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. *Acta Haematologica*, v.102, p.148-151, 1999.

ANEXO

Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar da pesquisa: "**EFEITO DA AUTO-HEMOTERAPIA MENOR, AUTO-HEMOTERAPIA MENOR OZONIZADA E INSUFLAÇÃO RETAL DE OZÔNIO SOBRE PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS DE CÃES HÍGIDOS**".

Você foi selecionado, pois seu cão está sadio, e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Esse experimento está sendo realizado pois existe a necessidade de buscarmos novas alternativas que ajudem a melhorar a qualidade de vida dos animais, com poucos efeitos colaterais.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em receber em seu domicílio a aluna de mestrado que efetuará as coletas de sangue e o tratamento.

Os riscos relacionados com a participação do animal serão discreta dor nos locais de colheita de material, de aplicação do sangue e estresse por contenção.

O procedimento a ser realizado em seu animal será:

Grupo auto-hemoterapia: **colheita simples de sangue venoso em três momentos para exames laboratoriais**. Na qual seu animal será contido e após assepsia da pele, será introduzida uma agulha para a coleta de sangue à vácuo. **Dez tratamentos com intervalos de 48 horas**, que consistirão em colheita de 5 mL de sangue e aplicação intramuscular do mesmo.

Grupo auto-hemoterapia ozonizada: **colheita simples de sangue venoso em três momentos para exames laboratoriais**. Na qual seu animal será contido e após assepsia da pele, será introduzida uma agulha para a coleta de sangue à vácuo. **Dez tratamentos com intervalos de 48 horas**, que consistirão em colheita de 5 mL de sangue, que será tratado com ozônio e aplicação intramuscular do mesmo.

Grupo insuflação retal: **colheita simples de sangue venoso em três momentos para exames laboratoriais**. Na qual seu animal será contido e após assepsia da pele, será introduzida uma agulha para a coleta de sangue à vácuo. **Dez tratamentos com intervalos de 48 horas**, que consistirão em aplicação retal de ozônio por meio de sondagem. Seu animal será contido e após passagem de sonda no reto, será insuflado volume menor ou igual a 60 mL. O volume será determinado pelo peso do animal.

Durante todo o experimento seu animal será acompanhado pela pesquisadora e médicos veterinários responsáveis pelo caso.

O principal benefício relacionado com a participação do seu animal é ajudar a trazer informações importantes sobre um tratamento adjuvante para animais com diversos tipos de

doenças, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar os colegas médicos veterinários durante a prática médica.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Os dados informados serão o nome do animal, idade, peso, sexo e aqueles gerados através da pesquisa.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Fabíola de Oliveira Paes Leme

Escola de Veterinária da UFMG - (31) 3409-2227

Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha

31270-901 - BELO HORIZONTE - MG

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. Concordo na utilização das fotos do animal na apresentação da pesquisa e possíveis publicações.

Sujeito da pesquisa

Escola de Veterinária da UFMG

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - UFMG

Unidade Administrativa II (Prédio da FUNDEP)

Segundo Andar, Sala 2005

Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha

31270-901 - BELO HORIZONTE - MG

TEL.: 31 3409-4516

Horário de atendimento: de 9:00 às 12:00 e de 14:00 às 17:00