



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA E CISPLATINA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS COM
CARCINOMA DE EHRLICH.**

Laís Albuquerque van der Linden

Recife

2021

Laís Albuquerque van der Linden

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA E CISPLATINA EM
MODELO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS COM
CARCINOMA DE EHRLICH.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Evilda Rodrigues de Lima.

Co-orientadora:

Prof^ª. Dra. Ivone Antônia de Souza.

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

-
- L744a Albuquerque van der Linden, Laís
AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA E CISPLATINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
CAMUNDONGOS COM CARCINOMA DE EHRLICH / Laís Albuquerque van der Linden. - 2021.
64 f. : il.
- Orientadora: Evilda Rodrigues de Lima.
Coorientadora: Ivone Antonia de Souza.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, Recife, 2021.
1. Câncer. 2. Oncologia. 3. Ozônio. 4. Insuflação retal. I. Lima, Evilda Rodrigues de, orient. II. Souza,
Ivone Antonia de, coorient. III. Título

CDD 636.089

RESUMO

Neoplasias representam uma das principais causas de morte em humanos e animais, é uma doença complexa caracterizada pela modificação permanente do material genético das células. A ozonioterapia é descrita como uma abordagem terapêutica para o tratamento coadjuvante do câncer e dos efeitos colaterais associados à quimioterapia e radioterapia. O objetivo deste trabalho foi avaliar os camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich submetidos aos tratamentos com ozonioterapia intrarretal e cisplatina. O experimento, consistiu na utilização de 25 camundongos, albinos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas com aproximadamente 60 dias de idade, apresentando peso corpóreo entre 35g e 40g, inoculados com o carcinoma de Ehrlich, divididos em quatro grupos, Grupo G1: Controle positivo: 2,5mg/kg de Cisplatina; Grupo G2: Mistura Ozônio Oxigênio via Insuflação Retal; Grupo G3: 2,5mg/kg de Cisplatina + Mistura Ozônio Oxigênio via Insuflação Retal e Grupo G4: Controle negativo 1ml de soro Fisiológico 0,9%. Os animais de todos os grupos foram submetidos a um período de adaptação de oito dias, em que nos grupos G2 e G3 foram submetidos a ozonioterapia via insuflação retal durante seis dias. Após este período realizou-se a inoculação das células do carcinoma de Ehrlich em todos os animais. Após 48h da inoculação se iniciou os diferentes tratamentos durante seis dias, ao fim do experimento, foi realizada a eutanásia dos animais e feita a coleta de sangue, através da punção cardíaca, e a remoção do tumor e órgãos (pulmão, baço, rins e fígado). Os resultados relacionados com o hemograma, perfil renal e hepático não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos para as variáveis analisadas. No peso do tumor e de cada um dos órgãos analisados (Pulmão, Baço, Rim, Fígado) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Para estas variáveis se destaca que a média do peso do tumor foi maior no grupo G4 (3,83 g), foi menor no grupo G3 (0,79 g). E essas diferenças significativas foram notadas entre o controle negativo com os demais grupos. No exame histopatológico não foram notadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos. Conclui-se que de acordo com os resultados a ozonioterapia associada a cisplatina demonstrou ser o tratamento em que os camundongos com carcinoma de Ehrlich apresentaram o menor peso do tumor. As ações terapêuticas no grupo tratado apenas com ozonioterapia proporcionaram aumento no consumo do alimento, como também, uma atividade antitumoral semelhante ao grupo tratado apenas com cisplatina.

Palavras chave: Câncer, Oncologia, Ozônio, Insuflação retal.

ABSTRACT

Neoplasms represent one of the main causes of death in humans and animals, it is a complex disease characterized by permanent modification of the cell's genetic material. Ozone therapy is described as a therapeutic approach for the coadjuvant treatment of cancer and side effects associated with chemotherapy and radiotherapy. This paper aims to evaluate albino Swiss mice (*Mus musculus*) with Ehrlich carcinoma submitted to treatments with intrarectal ozone therapy and cisplatin. The experiment consisted of using 25 Swiss albino mice (*Mus musculus*), females with approximately 60 days old, with body weight between 35g and 40g, inoculated with Ehrlich carcinoma, divided into four groups, Group G1: Positive control: 2.5mg / kg of Cisplatin; Group G2: Ozone-Oxygen Mixture via Rectal Insufflation; Group G3: 2.5mg / kg of Cisplatin + Ozone-Oxygen Mixture via Rectal Insufflation and Group G4: Negative control 1ml of 0.9% saline solution. Animals in all groups underwent an adaptation period of eight days, in which groups G2 and G3 were subjected to ozone therapy via rectal insufflation for six days. After this period, Ehrlich carcinoma cells were inoculated in all animals. After 48h of the inoculation, the different treatments were started for six days, at the end of the experiment the animals were euthanized, blood was collected through cardiac puncture, and the tumor and organs were removed (lung, spleen, kidneys and liver). The results related to the blood count, renal and hepatic profile did not show statistically significant differences ($p < 0.05$) between the groups for the analyzed variables. The weight of the tumor and each of the organs analyzed (Lung, Spleen, Kidney, Liver) showed statistically significant differences between the groups. For these variables, it is highlighted that the tumor average weight was higher in the G4 group (3.83 g), it was lower in the G3 group (0.79 g). And these significant differences were noted between the negative control group with the other groups. In the histopathological exam, there were no statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups. It is concluded that, according to the results, ozone therapy associated with cisplatin proved to be the treatment in which mice with Ehrlich carcinoma had the lighter tumor weight. The therapeutic actions in the group treated only with ozone therapy provided an increase in food consumption, as well as an antitumor activity similar to the group treated only with cisplatin.

Key words: Cancer, Oncology, Ozone, rectal Insufflation.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Roberto de Souza van der Linden e Kátia Maria Albuquerque van der Linden, irmãos Bianca Albuquerque van der Linden e Roberto Albuquerque van der Linden, companheiro Bernardo Rocha Guimarães de Souza e familiares por todo o apoio, incentivo e amor transmitidos.

Aos meus amigos por todo suporte e acolhimento, em especial à Rhaysa Allayde Silva Oliveira e Marina Cavalcanti Pereira que sempre me auxiliaram no suporte emocional e intelectual durante o período do mestrado.

Aos meus animais Litha, Maia, Maggie e Maria por serem um incentivo para que eu continue me aprofundando na medicina veterinária integrativa como forma de trazer uma melhor qualidade de vida para elas e outros pacientes.

À minha orientadora Evilda Rodrigues de Lima por todo o conhecimento fornecido, por toda paciência e compreensão durante esses anos através do auxílio na realização do mestrado e realização da dissertação.

À minha Co-orientadora, Ivone Antônia de Souza, por me ensinar e dar todo o suporte para o manejo dos animais utilizados na pesquisa assim como pela parceria com a UFPE e por toda paciência, ajuda e tempo dedicado a pesquisa no manejo dos animais.

À toda a equipe do Biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pelos conhecimentos transmitidos e grande apoio prestado em um momento tão difícil como o que passamos em meio a Pandemia.

Às professoras Lilian Andrade e Mirian Teixeira, pelo suporte e participação na elaboração da dissertação e pesquisa.

Ao Professor Fernando Leandro dos Santos pelos ensinamentos, dedicação e disponibilidade na histopatologia, a leitura e descrição das lâminas.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Animal da UFRPE, em especial, ao Dr. Alluanan, pela disponibilidade e dedicação na elaboração das lâminas para análise histopatológica.

Aos colegas Yasmin Theonise Ferreira Chaves e Ykaro Kyokay por todo o auxílio durante a realização do experimento.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro e a todos os servidores da UFRPE que ajudaram direta ou indiretamente para a execução desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,3-DPG - 2,3 difosfoglicato

ATP - Adenosina Trifosfato

C. Max – Concentração máxima.

C. Min – Concentração mínima.

CAT - Catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA K2 – Ácido Etileno Diamino Tetracético dipotássico

G-6PD - glicose 6-fosfato desidrogenase

GSH - glutationa

GSH-Rdglutaciona redutase

GSSG - glutaciona oxidada

H&E - coloração Hematoxilina-Eosina

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IR – Insuflação Retal

IRP1 - proteína 1 reguladora do ferro

IRP2 - proteína 2 reguladora do ferro

MAH – Auto-hemoterapia principal/Maior.

MiAH – Auto-hemoterapia secundária/Menor.7

MOO – Mistura Oxigênio Ozônio

NADP - fosfato de dinucleotídeo de adenina

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido

O₃ – Ozônio.

O3/O2 – Ozônio medicinal ou Mistura Oxigênio Ozônio

RNAm - ácido ribonucleico mensageiro

SOD – Superóxido Desmutase

SRATB - Substância Reativa do Ácido Tiobárbiturico.

TfR1 - receptor-1 de transferrina

TSE – Tumor Sólido de Ehrlich

VO – Via oral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados estatísticos das variáveis relacionadas com o hemograma de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos com carcinoma de Ehrlich. ...	19
Tabela 2 – Resultados estatísticos das variáveis relacionadas com a bioquímica sérica de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos com carcinoma de Ehrlich.	21
Tabela 3 – Resultados estatísticos do peso em modelo experimental de camundongos albinos Swiss (<i>Mus musculus</i>) com carcinoma de Ehrlich.	23
Tabela 4 – Resultados estatísticos do peso do tumor, pulmão, baço, rim e fígado em modelo experimental de camundongos com carcinoma de Ehrlich.	24
Tabela 5 – Avaliação das alterações histopatológicas no tumor de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos Ibinos Swiss (<i>Mus musculus</i>) com carcinoma de Ehrlich.	29
Tabela 6 – Avaliação das alterações histopatológicas no rim de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos Ibinos Swiss (<i>Mus musculus</i>) com carcinoma de Ehrlich.	30
Tabela 7 – Avaliação das alterações histopatológicas no fígado e baço de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos Ibinos Swiss (<i>Mus musculus</i>) com carcinoma de Ehrlich.	31
Tabela 8 – Avaliação das alterações histopatológicas no pulmão de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos Ibinos Swiss (<i>Mus musculus</i>) com carcinoma de Ehrlich.	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Adaptação por patologia dos procedimentos mais frequentes em medicina veterinária que utilizam ozônio descritos na Declaração de Madrid sobre ozonioterapia 2020.

..... 9

Quadro 2 - Concentrações, volumes e doses referentes a utilização de ozonioterapia via insuflação retal (IR) nas concentrações e doses baixas, médias e altas..... 15

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Peso do tumor em gramas de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos com carcinoma de Ehrlich..... 25

Gráfico 2 - Média do consumo de alimento por dia de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos lbinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.27

Gráfico 3 - Média da ingestão de água por dia de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos lbinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Corte histológico do tumor do grupo G1, tumor mimetiza septações na parte central, entremeado por vacúolos grandes e bem definidos, H&E, 100X. B – Corte histológico do tumor do grupo G1, H&E, 400X. (C) Corte histológico do tumor do grupo G2 infiltração do tumor no tecido adiposo periférico, H&E, 100X. (D) Corte histológico do tumor do grupo G2, H&E, 400X. (E) Corte histológico do tumor do grupo G3 fragmento de tumor em uma das extremidades apresenta feixe de músculo e zonas de necrose de coagulação, H&E, 100X. (F) Corte histológico do tumor do grupo G3 fragmento de tumor em uma das extremidades, H&E, 400X. (G) Corte histológico do tumor do grupo G4 extensa necrose disposta sempre de forma de feixes e hemorragia. Periféricamente tumor mais ativo, H&E, 100X. (H) Corte histológico do tumor do grupo G4, H&E, 400X.35

Figura 2 - (A) Corte histológico do fígado de animal do grupo G1 com foco de metástase (seta), junto a um ramo da veia porta. H&E, 100X. (B) Foco de metástase (seta), junto a um ramo da veia porta. H&E, 400X. (C) Corte histológico de fígado do Grupo G3 com presença de um foco metástase (Seta) localizada próxima a um vaso, H&E, 100X. (D) Grupo G3 com presença de um foco metástase (Seta), H&E, 400X..... 36

Figura 3 – (A) Corte histológico do rim de animal do grupo G4 com metástase em hilo renal. H&E, 100X. (B) Corte histológico do rim com metástase em hilo renal. H&E, 400X. 36

Figura 4 – (A) Corte histológico do baço G1 (CM) com rarefação dos elementos linfocitários, atrofia de folículos linfóides (seta). H&E, 100X. (B) Corte histológico do baço com rarefação dos elementos linfocitários. H&E, 400X. (C) Corte histológico do baço grupo G3 pouco celularizado, e atrofia dos folículos linfóides, com presença de metástase (seta). H&E, 100X. (D) Corte histológico do baço G3 com rarefação dos elementos linfocitários, metástase (Seta). (D) Corte histológico do baço com presença de células tumorais H&E, 400X. 37

Figura 5 – (A) Corte histológico do pulmão do Grupo G4 apresentando congestão moderada, observa-se metástase, com células predominantemente arredondadas no tecido adiposo. H&E, 100X. (B) Metástase em pulmão Grupo G4, H&E, 400X. (C) Corte histológico de pulmão do Grupo G3, embolo de células tumorais no interior de artéria pulmonar, H&E, 100X. (D) Embolo de células tumorais no interior de artéria pulmonar, grupo G3. H&E, 400X... 38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	3
2.1	Geral.....	3
2.2	Específicos	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	Neoplasias	4
3.2	Neoplasia da glândula mamária	Erro! Indicador não definido.
3.3	Carcinoma de Ehrlich	5
3.4	Ozonioterapia	5
3.4.1	Histórico do Ozônio	5
3.4.2	Utilização do ozônio.....	6
3.4.3	Ozonioterapia na oncologia.....	7
3.4.4	Ozonio Medicinal	9
3.4.5	Contraindicações	9
3.4.6	Reações Bioquímicas do ozônio	10
3.4.7	Concentrações e Doses recomendadas para Ozonioterapia	10
3.4.8	Vias de aplicação.....	11
3.4.9	Vias de aplicação que nunca devem ser utilizadas:.....	11
3.4.10	Vias que não tem total consenso para indicação terapêutica:.....	12
3.4.11	Ozonioterapia insuflação retal.....	12
3.5	Exames laboratoriais	13
3.5.1	Hemograma	13
3.5.2	Perfis renal e hepático.	14
3.5.3	Histopatológico	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Local do experimento	16
4.2	Animais	16
4.3	Experimento.....	16
4.4	Procedimentos para inoculação do carcinoma de Ehrlich	17
4.5	Tratamento com ozonioterapia por insuflação retal.....	17
4.6	Método de indução de morte.....	17
4.7	Coleta de sangue e processamento do material biológico	17
4.8	Avaliar peso do tumor e órgãos após eutanásia	18

4.10	Análise estatística	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO	39
7	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O câncer é o crescimento desordenado de células que invadem órgãos e tecidos, pode espalhar-se para outras regiões, o que se conhece como metástase. Atualmente, existem mais de 100 tipos de câncer na literatura médica mundial. Sendo o câncer de mama o mais comum em mulheres no Brasil e no mundo. No ano de 2018 foram estimados 59.700 novos casos de câncer de mama no Brasil (Ministério da Saúde, 2018).

Na literatura veterinária, a neoplasia mamária é frequentemente relatada nas espécies canina e felina, representando o tumor mais comum em fêmeas caninas e o terceiro mais comum em gatas. A maior parte delas é maligna e associada à elevada mortalidade (Cassali *et al.*, 2020).

O carcinoma de Ehrlich é um tumor de rápido crescimento e comportamento agressivo, utilizado como modelo experimental em camundongos fêmeas, correspondente ao adenocarcinoma mamário. Este pode ser um modelo comparativo para diversas pesquisas contra o câncer (Santos, 2016). Estudos comparativos sobre o aparecimento e evolução de tumores em relação à depressão do sistema imunológico revelaram que quanto mais deprimidas as respostas imunes mais facilmente às células neoplásicas prevalecem (Baiochi, 1986).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece, de forma integral e gratuita, 29 procedimentos de Práticas Integrativas e Complementares (PICS) à população. Esta prática possui embasamento científico, mostrando os benefícios do tratamento integrado entre medicina convencional e práticas integrativas e complementares, a ozonioterapia está citada dentro desta política (Ministério da Saúde, 2020).

Quanto ao uso medicinal do ozônio, já é reconhecido como terapia nos sistemas de saúde de vários países, como Itália, Espanha, Portugal, Rússia e algumas cidades dos Estados Unidos (CFMV, 2020). O Conselho Federal de Medicina Veterinária, em 22 de outubro de 2020, editou a Resolução Nº 1364 que define a ozonioterapia em animais compreendida a indicação, prescrição e a aplicação como atividade clínica privativa do Médico Veterinário.

O gás ozônio pode ser encontrado naturalmente na estratosfera, sua estrutura molecular é composta por três átomos de oxigênio. O gás quando puro tem uma cor azul-celeste pálida, seu peso molecular é 48,00u e sua molécula diatômica de oxigênio apresenta 32,00u. A solubilidade do ozônio em água é 10 vezes maior que a do oxigênio,

consequentemente, essa característica permite reação imediata com quaisquer compostos solúveis ou biomoléculas presentes em fluidos biológicos (Cepero *et al.*, 2015).

A primeira aplicação médica relatada do uso de ozônio foi para tratar gangrena pós-traumática em soldados alemães durante a Primeira Guerra Mundial, no entanto, um importante passo à frente foi a invenção de um gerador de ozônio médico confiável pelo físico Joachim Hansler (1908–1981). A utilização técnica na medicina foi inspirada pela escassez de antibióticos, frente às propriedades antimicrobianas e propriedades desinfetantes do ozônio. Não surpreendentemente, o dentista suíço E.A. Fisch (1899-1966) foi o primeiro a usar o ozônio na prática (Bocci, 2011a).

Desde então, assim como citado na Declaração de Madrid sobre Ozonioterapia de 2020, o uso do ozônio medicinal tem sido indicado para doenças digestivas, leishmaniose, hematologia, hepatopatia, nefropatias, oncologia, odontologia, endocrinologia, oftalmologia, doenças cardiorespiratórias, doenças do trato genitourinário, dermatologia, neurologia, traumatologia (Hernández Avilés, 2017; Güzel, Yildar, Erdikmen, 2011; Altinok Yipel, Abuzer, Mustafa, 2016; Kosachenco, et al 2018; Marchegiani *et al.*, 2019).

Estudos mostram que a ozonioterapia pode ser uma terapia coadjuvante em adição aos tratamentos convencionais de câncer. São relatadas aplicações intratumoral, intrarretal, intraperitoneal, além da autohemoterapia maior e menor como possíveis vias de administração da Mistura Oxigênio Ozônio (MOO) em tratamentos oncológicos (Waked, Nagib e Omar, 2013; Megele *et al.*, 2018). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os camundongos albinos swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich submetidos aos tratamentos com ozonioterapia intrarretal e cisplatina.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich submetidos aos tratamentos com ozonioterapia intrarretal e cisplatina.

2.2 Específicos

- Identificar as alterações dos parâmetros hematológicos e dos perfis renal e hepático em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich após tratamento com ozonioterapia intrarretal e cisplatina.;
- Caracterizar as alterações microscópicas em rins, baço fígado, pulmões e do carcinoma de Ehrlich em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) após o tratamento com ozonioterapia intrarretal e cisplatina.;
- Verificar a variação de peso dos camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) através de pesagens periódicas durante o experimento;
- Verificar atividade antineoplásica após o tratamento com ozonioterapia intrarretal e cisplatina em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Neoplasias

A palavra neoplasia corresponde ao crescimento desordenado e incontrolável número de células, que pode ser benigna ou maligna. Ao contrário da palavra “câncer”, que é termo utilizado para se reportar a neoplasia maligna, caracterizada como o conjunto de mais de 100 doenças com crescimento rápido e desordenado de células que agrupam-se formando tumores malignos. Por outro lado, os tumores benignos são aqueles que correspondem ao aumento de células mais diferenciadas que em geral tem crescimento lento e ocorre de forma mais organizada apresentando limites nítidos (INCA, 2020b).

Os diferentes tipos de câncer podem ser classificados de acordo com os vários tipos de células que lhe deram origem. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas. E a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos são conhecidos como metástase (INCA, 2020b).

A enfermidade está entre as quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de vida dos seres humanos. Este percentual é devido ao envelhecimento e, também, pela mudança na distribuição e prevalência dos fatores de risco como o desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2020b).

Ocorreu uma transição entre as causas principais de câncer observados nos países em desenvolvimento, observa-se o declínio dos tipos de câncer associados a infecções e o aumento daqueles associados à melhoria das condições socioeconômicas com a incorporação de mudanças de hábitos e atitudes associados à urbanização, sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros (Bray *et al.*, 2018).

Na medicina veterinária as neoplasias malignas apresentam maior taxa de morbidade e é uma das principais causas de morte em animais domésticos, por exemplo, sendo responsáveis por 27% das mortes em cães de raça pura no Reino Unido (Adams *et al.*, 2010). Sua prevalência tem aumentado nos últimos anos, possivelmente relacionada à maior expectativa de vida dos animais de companhia (Vail *et al.*, 2019). Em cães, as de maior ocorrência são as neoplasias cutâneas, mamárias, reprodutivas, digestivas e linfopoiéticas (De Nardi *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2012; Sprenger, 2015).

Através de pesquisas realizadas em animais e humanos observa-se que os tratamentos utilizados para o câncer como radioterapia e quimioterapia apresentam altos índices de efeitos colaterais indesejáveis. Mostrando-se também muitas vezes ineficientes (Suffredini, 2002). Estudos com uso de tumores experimentais, como o carcinoma de Ehrlich possuem a vantagem em comparação com as demais devido ao conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais (Valadares, 2002; Palermo-Neto, 2003).

3.2 Carcinoma de Ehrlich

O carcinoma de Ehrlich é uma neoplasia indiferenciada e cresce rapidamente caracterizada por maior consumo de glutamina, secretando uma variedade de citocinas imunossupressoras. Evento que resulta na disfunção de células T, NK e no recrutamento de macrófagos supressores (Segura, Barbero e Márquez, 2000). O carcinoma de Ehrlich se assemelha a tumores humanos, mais sensíveis à quimioterapia, corresponde ao adenocarcinoma mamário nas fêmeas de camundongos, e desta modo pode ser usado como modelo experimental para humanos (Ozaslan, 2011; Dias, 2017).

Modelos experimentais *in vivo* continuam proporcionando vantagens em pesquisas na área da saúde. Destacando-se os tratamentos para doenças coronarianas, câncer, diabetes, doenças crônico-degenerativas, vacinas (Ferreira, Hochman e Barbosa, 2005).

3.3 Ozonioterapia

3.3.1 Histórico do Ozônio

Em 1785, o físico alemão Martinus von Marum detectou pela primeira vez a presença do gás na superfície da Terra, mas apenas em 1840, Schonbein Christian Frederich realizou a identificação e nomeia o gás como ozônio, do grego *ozein*, que significa “que emana um odor” (Bocci, 2011b; Rodriguez, 2017).

O ozônio é um gás encontrado naturalmente na estratosfera, formando uma camada que bloqueia a passagem de radiação ultravioleta excessiva (Rowland, 2009). Devido à baixa estabilidade do ozônio é necessário produzi-lo *In-situ*, ou seja, no próprio local e momento da utilização. O equipamento utilizado para esses fins é chamado de ozonizador ou gerador de ozônio (Rodríguez, 2017).

Habitualmente esse gás pode ser obtido através dos métodos: plasma frio, denominado Descarga Elétrica por Barreira Dielétrica (DBD); por radiação ultravioleta (simulando o método de obtenção da camada de ozônio) especificamente o comprimento de onda (<200

nm, por ser a área onde a molécula de oxigênio absorve); e mediante eletrólise (Stopka, 1987; Shimamune e Isawamoto, 1993; Simek e Clupek, 2002).

A DBD é a forma mais utilizada e consiste na aplicação de uma alta voltagem, da ordem de 5 a 15kV, entre dois eletrodos metálicos concêntricos separados por um dielétrico (cerâmica ou vidro) e uma janela da ordem de alguns milímetros. Nesta janela, entre o dielétrico e o eletrodo, se forma os filamentos da descarga e ao passar oxigênio ou ar, como gás insumo, se forma o O₃. Este método permite a produção de O₃ em até 13% em peso a partir do oxigênio (Rodríguez, 2017).

O conceito que o ozônio deriva do oxigênio quando uma descarga elétrica foi gerada por uma corrente voltaica arco foi praticamente aplicado pelo químico Werner von Siemens, que inventou o chamado tubo de superindução (tubo de Siemens), que consiste em dois eletrodos interpostos placas colocadas em uma alta tensão que, na presença de oxigênio, poderia gerar algum ozônio. Tornou-se possível produzir ozônio à vontade e esclarecer que o ozônio é na verdade, um gás muito reativo e instável (Bocci, 2011b).

3.3.2 Utilização do ozônio

Devido as ações bactericidas, fungicidas e virostáticas as aplicações do ozônio tem sido indicadas em diversas áreas, sendo muito empregado principalmente em aplicações industriais na desinfecção de água (Cepero et al, 2015). Como a demanda por água aumenta a cada dia e é essencial para prevenir a propagação de doenças infecciosas, a importância do ozônio nas aplicações práticas tornou-se particularmente importante. A International Ozone Association (IOA) monitora cuidadosamente todas as aplicações e publicações em revista científica "Ozone Science and Engineering" (Bocci, 2011b).

A utilização terapêutica do ozônio é devido a grande capacidade de modular o estresse oxidativo biológico, o gás vai proporcionar a oxidação quando perde elétrons para outra substância devido à formação de segundos mensageiros, resultando em um efeito antioxidante pelo organismo, atuando sistemicamente na melhora da resposta imune e circulatória, pois desencadeia a melhora da flexibilidade de hemácias e a entrega de oxigênio. Além disso, possui propriedades anti-inflamatórias e antissépticas (Viebahn-Hänsler, 2012; Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020).

São citados entre os benefícios da terapia com ozônio medicinal, no aumento de 2,3 DPG, diminuição da produção de interleucinas 1 e 2, fator de necrose tumoral (TNF) e interferons. Proliferação de linfócitos, imunoglobulinas, aumento de prostaciclina, diminuição do grau de hipóxia tecidual, ativação de mecanismos de desintoxicação, aumento

da capacidade antioxidante endógena. Melhora da microcirculação, ação sobre o ácido araquidônico e sua relação com a cascata inflamatória (Honn e Skoff, 1981; Bocci, 2005; Bocci, 2006; Pecorelli e Bocci, 2013).

3.3.3 Ozonioterapia na oncologia.

Vários estudos propondo o uso da ozonioterapia como adjuvante ao tratamento do câncer já foram publicados, desde ensaios *in vitro* e *in vivo*, no entanto, ainda merece mais pesquisas, incluindo ensaios clínicos randomizados específicos (Clavo, 2018).

São citadas como potencialidades do ozônio como agente antimetástático, e com atividades de regulação do metabolismo do oxigênio e oxigenação, no uso da via aeróbia para a produção de energia e reestabelecimento das funções metabólicas normais. Controla ainda a acidose láctica, o que promove a melhora da oxigenação do tumor de forma significativa e aumentando constantemente a disponibilidade de oxigênio, proporcionando que a microcirculação possa desacelerar o crescimento do tumor e inibir a metastização. Em segundo lugar, o estresse oxidante leve e transitório produzido por essa terapia estimula o aumento de enzimas antioxidantes celulares capazes de inibir o estresse oxidativo crônico (Hernández *et al.*, 1995; Bocci, 2002; Larini e Bocci, 2005).

No câncer, um estresse oxidativo persistente foi observado como um fator que favorece a progressão da invasão e formação de metástase (Toyokuni *et al.*, 1995). O sítio ideal para as células cancerosas é aquele em ambiente hipóxico. E isso pode significar que elas têm um sistema antioxidante rudimentar para se livrar das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Então, o ozônio poderia exercer efeitos citotóxicos importantes nas células neoplásicas se elas tiverem um sistema defensivo deficiente, através da modulação do sistema imunológico possibilitando uma resposta contra as células tumorais (Hernández *et al.*, 1995; Bocci, 2002; Ajamieh *et al.*, 2004; Ajamieh *et al.*, 2005; Larini e Bocci, 2005).

A ozonioterapia é recomendada como prática adjuvante na terapêutica oncológica, como demonstrada no Quadro 1, onde são indicadas as vias autohemoterapia maior, autohemoterapia menor, insuflação retal, intra-lesional e subcutânea (Hernández, 2017; Güzel, Yildar e Erdikmen 2011; Avilés, Rojo e González, 2016). Até hoje, comprovadamente, a utilização da ozonioterapia tem sido adjuvante no tratamento de câncer (Clavo *et al.*, 2015).

Quadro 1 - Procedimentos mais frequentes em medicina veterinária que utilizam ozônio descritos na Declaração de Madrid sobre ozonioterapia 2020.

Oncologia					
Vias de Administração					Observações
MAH	MiAH	IR	Intralesional	Subcutâneo	
C. Min – C.	C. Min – C.	C. Min – C.	C. Min – C.	C. Min – C.	
Max.	Max.	Max.	Max.	Max.	
(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	
Vol. Sangue	Vol. Sangue	Vol. O ₂ /O ₃	Vol. O ₂ /O ₃	Vol. O ₂ /O ₃	
Sessões	Sessões	Sessões	Sessões	Sessões	
10-35	10-35	10-35	15-50	20-35	*Número de
1-1,5 ml/kg	1,5 ml/10kg	3 ml/kg	0.5	Peritumoral	sessões
8-indefinido	5-15	10-20**	mL/ponto	indefinido *	depende do
*/**			indefinido *		processo
					** Ciclos a
					cada 3
					meses

Fonte: Adaptado de Avilés (2020).

Uma pesquisa realizada em pacientes com Linfedema relacionado ao câncer de mama, mostrou que a terapia com ozônio pode ser clinicamente eficaz na redução do volume do membro e da espessura subcutânea nas pacientes. A técnica pode ser considerada uma prática adjuvante, além da terapia padrão ouro que inclui drenagem linfática manual, vestimenta de compressão e cuidados com a pele no tratamento de mulheres com linfedema relacionado ao câncer de mama (Waked, Nagib e Omar 2013).

Estudos em modelos experimentais tem sido conduzidos para avaliação da eficácia da ozonioterapia na prática oncológica. A via intraperitoneal é considerada em estudos pré-clínicos devido à dificuldade em administrar medicações intravenosas em animais. Coelhos e camundongos estão sendo utilizados nesse intuito (Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020).

Kızıltan *et al.* (2015) concluíram que ozonoterapia pela via intraperitoneal ou radioterapia são consideradas terapias eficazes quando administrado sozinho ou simultaneamente a camundongos com carcinomatose peritoneal, sugerindo que a terapia com ozônio pode servir como um método de obtenção efeitos antiedema e antitumoral, proporcionando um período mais longo de sobrevivência.

O uso de injeção de água ozonizada foi avaliado em estudo com animais experimentais, os achados pré-clínicos sugerem que o crescimento do tumor é suprimido após o tratamento, pois facilita o tratamento do antitumoral (cisplatina), aumentando a perfusão sanguínea (Kuroda, 2018).

Menéndez, Cepero e Borrego (2008) publicaram dois estudos pré-clínicos diferentes em camundongos. No primeiro estudo, as células de Ehrlich tumor ascítico e tumor de sarcoma 37 foram implantados no plexo ocular de camundongos. Após a implantação, os animais foram tratado com ozônio via insuflação retal em 12 sessões usando diferentes concentrações de ozônio. Observou-se que as menores concentrações de ozônio proporcionaram melhores resultados, tendo sido observado o potencial antimetastático com ozônio assim como adjuvante ao tratamento de câncer.

3.3.4 Ozônio Medicinal

Ozonioterapia é um tratamento médico complementar, que utiliza a mistura dos gases oxigênio e ozônio (95-99,95% de oxigênio e 0,05% e 5% de ozônio), gerada por um equipamento médico certificado. Dependendo da via de aplicação o ozônio pode atuar por: oxidação direta ou uma via indireta: A resposta depende da modulação de mecanismos de transdução nuclear e sinais como Nrf2-NFkB e síntese de proteínas. O gerador de ozônio medicinal deve permitir as medições de concentrações precisas de ozônio (1 µg/mL-80 µg/ml), afim de se obter uma mistura homogênea de oxigênio-ozônio. A concentração expressa em µg/ml e deve ter uma margem de erro igual ou melhor que $\pm 10\%$. Nenhuma outra substância além O₂ e O₃ podem estar presentes na mistura de gases produzida (Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020).

Utiliza-se um cilindro com oxigênio (O₂) conectado ao aparelho pelo qual são emitidas descargas elétricas sobre o gás que se dissocia em duas moléculas de oxigênio atômico (O) e se unem novamente a moléculas de oxigênio, originando o O₃, sendo gerada a chamada mistura oxigênio-ozônio (Cardoso, 2009; Rodríguez, 2017).

3.3.5 Contraindicações

A utilização da ozonioterapia é contraindicada nos casos de deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, hipotireoidismo não controlado, primeiros três meses de gestação. A autohemoterapia é contraindicada nos casos de leucemia (Viebahn-Hänsler, 2012).

3.3.6 Reações Bioquímicas do ozônio

A grande solubilidade do ozônio na água permite reação imediata com quaisquer compostos solúveis ou biomoléculas presentes em fluidos biológicos. Podem ser gerados traços de polímeros de oxigênio (O₄) ou polímeros de ozônio (O₆ e O₉). Contudo, a ideia de que polímeros podem ter um papel terapêutico é puramente especulativa (Cacace *et al.*, 2001; Murai *et al.*, 2003).

Ao penetrar no organismo, o ozônio, primeiro se dissolve nos fluidos corpóreos, mas, ao contrário do oxigênio que se difunde livremente em outros compartimentos, ele reage imediatamente com qualquer biomolécula, particularmente Ácidos Graxos Poli-Insaturados (PUFA), produtores de ERO e Produtos de Oxidação Lipídica (LOPs). Assim, podemos determinar o destino do ozônio medindo os LOPs na circulação intestinal-portal e periférica (Bocci, 2011b).

É relatada a produção de ozônio *in vivo* através da ativação de leucócitos humanos, os autores trazem a importância da análise das consequências benéficas e prejudiciais da produção desse produto, pois a molécula é altamente reativa contra ligações duplas, poderia participar no combate de microorganismos invasores, rompendo suas membranas celulares, além de induzir a produção de citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral e IL-8, permitindo a amplificação da cascata inflamatória (Babior *et al.*, 2003).

Comporta-se de maneira semelhante aos mediadores clássicos de inflamação, como a cascata do complemento, pois possui ambas funções de efetor e amplificador. Embora a inflamação seja um componente necessário da defesa, não estão excluídas suas consequências prejudiciais. A produção de ozônio poderia desempenhar um papel importante em uma ampla variedade de patologias que variam da artrite à aterosclerose (Babior *et al.*, 2003; Nieva e Wentworth, 2004).

Estes estudos podem ser significativos para compreender o quão útil pode ser o ozônio em situações fisiológicas e patológicas. Notavelmente, mesmo os leucócitos ativados geram ozônio *in vivo*, podendo ser protetor ou prejudicial, dependendo de sua concentração e localização (Cepero *et al.*, 2015).

3.3.7 Concentrações e Doses recomendadas para Ozonioterapia

O termo hormese é descrito como respostas de doses bifásicas de células ou organismos (incluindo microrganismos) a um fator exógeno ou intrínseco em que o fator induz efeitos estimuladores ou benéficos em doses baixas e efeitos inibitórios ou adversos em

doses altas (DeCS, 2015). As indicações da ozonioterapia são baseadas na relação de efeito e dose, em que baixas doses podem desencadear papéis importantes dentro da célula, sendo a resposta ao ozônio hormética, isso está demonstrada clínica e experimentalmente (Re *et al.*, 2014; Delgado-Roche *et al.*, 2017).

A unidade reconhecida para a medida de mensuração da concentração do gás ozônio é preferencialmente expressa como $\mu\text{g/ml}$ (Cepero *et al.*, 2015). Concentrações de 10-40 $\mu\text{g/ml}$ da MOO representam níveis fisiologicamente eficazes e recomendados para aplicação sistêmica, como auto-hemoterapia e insuflação retal. Entretanto, a faixa de concentração de 60-100 $\mu\text{g/ml}$ é completamente restrito ao uso tópico, tem ação microbicida podendo ser utilizado nas aplicações em tratamento de feridas infectadas, pé diabético, úlceras de decúbito e queimaduras (Viebahn-Hänsler, 2012).

3.3.8 Vias de aplicação

Existem diferentes vias de aplicação da MOO, a escolha da via depende do processo patológico e condição geral clínica do paciente, em conjunto com a escolha da via de aplicação se faz a seleção da dose determinada pela concentração e volume deste para inocular (Rodríguez, 2017). As vias são classificadas em sistêmica e local, São consideradas vias sistêmicas: Autohemoterapia maior, Autohemoterapia menor, Insuflação retal, intraperitoneal; são consideradas vias de aplicação local: subcutânea Local em forma de bolsa ou ventosa, intra-articular, intravaginal, uretral, ótica e conjuntival (Rodríguez, 2017; Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020).

3.3.9 Vias de aplicação que nunca devem ser utilizadas:

- A) Por inalação: O ozônio oxida os antioxidantes disponíveis e reage instantaneamente com ácidos graxos poliinsaturados do surfactante (PUFA) presentes no ar e fluido de revestimento epitelial para formar espécies reativas de oxigênio que danificam o sistema respiratório, sintomas como dor de cabeça, tosse, garganta seca, peso peito, falta de ar são relatados e medidas de cuidados urgentes são necessários (Viebahn-Hänsler, 2012; Delgado, 2018).
- B) Diretamente injetado (injeção intravenosa): Alterações relacionadas a efeitos colaterais relacionados a embolia gasosa como tosse, tontura ambliopia, crise hipotensiva, parestesia dos membros e morte de cinco pacientes humanos é relatada (Bocci, 1999a; Zambello, 2004). 25-28

3.3.10 Vias que não tem total consenso para indicação terapêutica:

Injeção de água ozonizada: Ainda não há evidências que mostrem a eficácia de injeções de água ozonizada a 22 µg / NmL, tal técnica precisa ser demonstrada por ensaios clínicos (Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020).

Injeção de solução de glicose ozonizada: Não há evidências clínicas ou pré-clínicas para o uso de solução de glicose ozonizada, além disso essa reação entre ozônio e glicose gera aldeídos desconhecidos, que são potencialmente tóxicos para o organismo (Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020).

Via intraperitoneal: Efeitos colaterais diversos são descritos com o uso desta via, casos de mesotelioma, carcinomatose peritoneal ou peritonite são relatados no uso de injeção endoperitoneal ou endopleural (Bocci, 2011c).

3.3.11 Ozonioterapia insuflação retal

O uso de ozônio insuflação retal (I.R.) é a via relatada com menores efeitos colaterais e que tem suporte de ensaios pré-clínicos bioquímicos e moleculares, além do suporte de mais de 47.000 tratamentos, com 56 a 716 pacientes em ensaios clínicos, sendo desta forma considerada uma via segura (Renate, Sonia e Fahmy, 2016).

Esta é considerada a forma mais simples de aplicação da MOO. Se faz a introdução de uma sonda retal lubrificada, a profundidade depende do tamanho do indivíduo, sendo em pequenos animais introduzida em cerca de 5 cm. Em seguida é insuflada a quantidade pré-estipulada do gás de acordo com o descrito no Quadro 2. Enquanto é insuflado deve ser aplicada uma pressão no orifício anal para evitar retorno do gás. Após finalização do processo, se aplica a mesma pressão no esfíncter anal por 20 segundos, de modo a evitar o retorno do gás (Rodríguez, 2017).

Discute-se sobre a eficácia da via I.R. como uma via eficaz para terapia sistêmica, pois fatores como a presença de fezes e absorção incompleta pela mucosa retal devem ser levados em consideração (Bocci, 2013). Entretanto, já há estudo comparativo sobre a ação da insuflação retal de ozônio e auto-hemoterapia ozonizada mostrou que as duas vias foram capazes de reduzir alterações relacionadas a síndrome metabólica como pressão arterial e glicemia, mas cita a necessidade de especificar que a perda de peso e a atividade física representam as melhores práticas de prevenção e tratar a síndrome metabólica (Vaiano, 2016).

Os efeitos sistêmicos no organismo também são citados por Martínez-Sánchez (2012), Rodríguez (2017) e Joaquim (2019), através das veias retais, que por sua vez desembocam na

veia cava inferior por intermédio da veia hipogástrica, favorecendo a absorção de substâncias e sua difusão através dos tecidos, além de ser uma via que apresenta alta segurança. Lage-Marques (2008) cita que a I.R. promove a liberação de interleucinas, interferon e ATP, sendo a via de escolha para tratamento de diversas doenças sistêmicas.

Segundo a Declaração de Madrid Sobre Ozonoterapia as concentrações, volumes e doses da mistura oxigênio/ozônio que podem ser utilizadas na I.R., são descritas de acordo com a Quadro 2. Para a utilização em pacientes oncológicos são recomendados ciclos de 10 a 20 Sessões a cada 3 meses, sendo recomendado iniciar o tratamento com baixa concentração e aumentar em 5 μg a cada 2 ou 3 sessões (Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020).

Quadro 2 - Concentrações, volumes e doses referentes a utilização de ozonioterapia via insuflação retal (IR) nas concentrações e doses baixas, médias e altas.

	Conc. μg	Vol. mL/Kg	Dose $\mu\text{g/ml}$
BAIXA	10	3	30
	15		45
MÉDIA	20		60
	25		75
ALTA	30		90
	35		105

Fonte: Adaptado de Avilés, 2020.

Concentrações maiores que 40 $\mu\text{g/ml}$ podem provocar lesões nos enterócitos, a única exceção para uso de concentrações acima deste valor é em casos de colites hemorrágicas ulcerativas, em que se indica iniciar o tratamento com 60-70 $\mu\text{g/ml}$. Com a diminuição do sangramento se diminui a concentração (Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020).

3.4 Exames laboratoriais

3.4.1 Hemograma

Este exame é um importante aliado em estudos, pois demonstra através de dados quantitativos e qualitativos, alterações relativas ao sistema hematopoiético, uma vez que este é extremamente sensível a atividades de agentes tóxicos (Medeiros et al., 2009).

Alterações como trombocitopenia, anemia e leucopenia são comuns em pacientes submetidos à quimioterapia (INCA, 2018; Silva, Marcolino e Alves, 2020). Estudo realizado

em cadelas com neoplasia mamária mostrou que 24,2% dos animais apresentaram alterações no eritrograma, sendo a anemia moderada e leucocitose as alterações mais encontradas em animais em estádios avançados da doença (Silva, 2014).

Os achados relacionados ao hemograma são considerados indispensáveis para o acompanhamento de doenças crônicas em geral incluindo o acompanhamento da quimioterapia e radioterapia, relacionando-se com toda a patologia (Failace e Fernandes, 2015).

3.4.2 Perfis renal e hepático.

Os órgãos rins e fígado estão diretamente relacionados com a metabolização de grande parte das drogas utilizadas, sendo de grande interesse a avaliação de seus parâmetros. Os rins apresentam importante papel nas funções de excreção, regulação e endócrina. Alterações renais podem levar ao comprometimento multissistêmico. A uréia constitui o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, sendo que 90% são excretados pelos rins e o restante eliminado pelo trato gastrintestinal e pela pele. No entanto, é um preditor fraco da filtração glomerular, pois 40%-70% retornam para o plasma por um processo de difusão passiva tubular, que é dependente do fluxo urinário (Johnson, 2008).

A principal utilidade clínica da uréia consiste na determinação da razão uréia:creatinina séricas. Essa relação pode ser útil particularmente quando se avaliam pacientes com quedas abruptas da taxa de filtração glomerular (TFG), podendo apresentar-se alterada em estados patológicos diferentes, bem como na discriminação da azotemia pré e pós-renal (Johnson, 2008).

A creatinina é um produto residual da creatina e da fosfocreatina oriunda do metabolismo muscular. Apesar de representar a principal estratégia de identificação dessa síndrome, a creatinina é considerada um teste tardio. Ela se altera apenas quando já existe perda de aproximadamente 50% da função renal (Magro, 2007).

As provas de função hepática devem ser consideradas devido a grande quantidade de substâncias que são biotransformadas no fígado. Diversos processos patológicos são envolvidos com a elevação de enzimas hepáticas. A enzima aspartato aminotransferase (AST) pode ser encontrada em altas concentrações no citoplasma e mitocôndrias das células hepáticas, também pode ser encontrada no músculo esquelético, cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos, como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada

no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada. A alanina aminotransferase (ALT) pode ser encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma de hepatócitos, portanto, mais específica para lesão hepática quando ocorre seu aumento (Jorge, 2006; Henry, 2008).

3.4.3 Histopatológico

Para identificação e diagnóstico definitivo das neoplasias utiliza-se do exame histopatológico (Cassali *et al.*, 2020). Através da avaliação microscópica com o uso de lâminas coradas pela técnica histoquímica em hematoxilina e eosina (H&E) é possível estudar a morfologia celular e tecidual para predizer o comportamento de uma neoplasia, definindo a origem tecidual e se o tumor é benigno ou maligno meio da presença de células tumorais encontradas em vasos linfáticos ou sanguíneos (Sanches, Torres e Guerra, 2015).

O exame histopatológico permite a observação de detalhes celulares e avaliação da arquitetura tecidual neoplásica, além da sua relação com os tecidos vizinhos, a existência de invasão tecidual e a presença de possível comportamento metastático por meio da presença de células tumorais encontradas em vasos linfáticos ou sanguíneos (Sanches, Torres e Guerra, 2015).

O grau de malignidade nessas avaliações é baseado em avaliação de características morfológicas, arranjo arquitetônico tecidual, aumento da razão núcleo:citoplasma, critérios de diferenciação celular e anaplasia, invasividade, indícios de metástase, celularidade global, índice mitótico, presença/ausência de cápsula, quantidade de estroma e presença de necrose e de infiltrado inflamatório, que são examinados isoladamente ou em conjunto (Cheville, 2006; Sanches, Torres e Guerra, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

Esta pesquisa foi desenvolvida no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

4.2 Animais

Foram utilizados 25 camundongos Albino suíço (*Mus musculus*), fêmeas com aproximadamente 60 dias de idade, peso corpóreo de 35g a 43g, provenientes do biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, recebendo a mesma ração comercial e água *ad libitum*. Os camundongos foram submetidos a condições controladas de iluminação (ciclo claro e escuro de 12 horas cada). E pesagem diária dos animais e da ração.

Antes da realização da pesquisa o projeto de pesquisa foi submetido a apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPE) e o protocolo experimental foi aprovado pelo processo nº 0018/2020.

4.3 Experimento

Os 25 animais que constituíram o experimento foram divididos aleatoriamente em três grupos de seis e um de sete animais.

- Grupo 1 - Controle positivo – 2,5mg/kg de Cisplatina por via oral.
- Grupo 2 - Mistura Ozônio Oxigênio via insuflação retal.
- Grupo 3 - 2,5mg/kg de Cisplatina por via oral + Mistura Ozônio Oxigênio via insuflação retal.
- Grupo 4 - Controle negativo – 1ml de soro Fisiológico 0,9% por via oral

Os animais de todos os grupos foram submetidos a um período de adaptação de oito dias, em que nos grupos 2 e 3 foram submetidos a ozonioterapia via insuflação retal durante seis dias. Após este período se realizou a inoculação das células do carcinoma de Ehrlich em todos os animais e após 48h dessa inoculação se iniciou os diferentes tratamentos durante seis dias.

4.4 Procedimentos para inoculação do carcinoma de Ehrlich

As células viáveis do carcinoma de Ehrlich foram retiradas do tumor de animais de manutenção dos estudos no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Para o transplante das células cancerígenas foi feita aspiração das células do conteúdo tumoral e transplantado na região axilar de todos os animais, por via subcutânea, conforme a metodologia de Stock (1955) modificada obtendo-se, assim, a implantação do tumor sólido de Ehrlich (TSE).

4.5 Tratamento com ozonioterapia por insuflação retal.

Os animais foram submetidos ao tratamento diariamente, através do uso da utilização da MOO produzida com o uso de um gerador de ozônio medicinal modelo O&L1.5 RM Ozone&Life®. A MOO por via da insuflação retal, a concentração preconizada será segundo a Declaração de Madrid Sobre Ozonioterapia de 20 µg/ml (Schwartz, Sánchez e Lawyer, 2020) utilizando o volume de 1ml de gás (Kızıltan, 2015) diariamente entre 8h e 10h, por 12 dias, os animais foram sensibilizados seis dias antes da implantação do TSE e 6 dias após a implantação do TSE. Para a administração da MOO por via retal, foram utilizadas cânulas intravenosas de calibre 24, com os estiletos removidos.

4.6 Métodos de eutanásia.

Ao fim dos experimentos, os animais foram eutanasiados com uso de Xilazina e Ketamina, nas respectivas doses de 5 mg/kg e 75 mg/kg, Intra peritoneal.

4.7 Coleta de sangue e processamento do material biológico

A coleta de sangue nos camundongos foi realizada através da punção cardíaca, imediatamente após a eutanásia, com seringas descartáveis. O sangue (1,0 mL) foi transferido imediatamente para dois microtubos Labor Import®, um contendo EDTA K2 jateado na parede e o outro tubo sem anticoagulante para a obtenção do soro. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao laboratório e analisadas de acordo com as metodologias: Uréia: enzimático colorímetro, Creatinina: Jaffe modificado, alanina aminotransferase ALT/TGO: Reitmann e Frankel, aspartato aminotransferase AST/TGP: Reitmann e Frankel, Fosfatase Alcalina: Enzimático Colorímetro, Gama Glutamina: Cinético Contínuo, Bilirrubina: Jendrassik Modificado.

4.8 Avaliação peso do tumor e órgãos após eutanásia

Após a realização da eutanásia o tumor e os órgãos (pulmão, baço, rins e fígado) foram pesados em balança analítica Bell®, fotografados e posteriormente enviados para análise histopatológica no laboratório de anatomia patológica do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

4.9 Análise histopatológica

O tumor e os órgãos: pulmões, baço, rins e fígado foram fixados em formaldeído 10% em solução tampão neutra e encaminhados para avaliação histopatológica pelas técnicas rotineiras de desidratação, diafanização, inclusão em parafina, submetidos a cortes transversais de 4 μ , com micrótomo e corados com hematoxilina– eosina (HE).

4.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados quantitativos obtidos para as variáveis relacionadas com o hemograma, perfis renal e hepático foram expressos por meio das medidas de estatística descritiva: média, desvio padrão (média \pm DP), mediana e percentis 25 e 75 (mediana (P25; P75)). Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. A escolha do teste foi devido ao tamanho da amostra inferior a 8 casos por grupo. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 25.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados relacionados com o hemograma, no qual não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nas variáveis estudadas para o nível de significância fixado (5%).

Tabela 1 – Resultados estatísticos das variáveis relacionadas com o hemograma de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos com carcinoma de Ehrlich.

Variável	Grupos				Valor de p
	G1 (Controle positivo)	G2 (Ozonioterapia)	G3 (Ozonioterapia + Cisplatina)	G4 (Controle negativo)	
	Média ± DP Mediana (P25; P75)	Média ± DP Mediana (P25; P75)	Média ± DP Mediana (P25; P75)	Média ± DP Mediana (P25; P75)	
Hemácias	4,25 ± 0,39 4,27 (3,93; 4,60)	4,43 ± 0,19 4,50 (4,40; 4,52)	4,53 ± 0,33 4,55 (4,30; 4,76)	4,50 ± 0,36 4,50 (4,18; 4,80)	p ⁽¹⁾ = 0,734
Hemoglobina	12,60 ± 1,12 12,65 (11,75; 13,48)	13,01 ± 0,66 13,30 (13,00; 13,30)	13,55 ± 1,03 13,65 (12,75; 14,25)	13,68 ± 1,44 13,80 (12,35; 15,08)	p ⁽¹⁾ = 0,419
Hematócrito	37,83 ± 3,37 38,00 (35,25; 40,50)	39,17 ± 1,88 40,00 (39,00; 40,00)	40,67 ± 3,08 41,00 (38,25; 42,75)	40,17 ± 3,54 40,00 (37,25; 43,50)	p ⁽¹⁾ = 0,536
VCM	80,27 ± 19,92 88,80 (72,25; 90,25)	87,17 ± 2,26 87,50 (85,70; 88,80)	89,58 ± 2,19 90,00 (88,03; 91,25)	88,87 ± 2,27 88,80 (87,05; 90,60)	p ⁽¹⁾ = 0,265
HCM	28,67 ± 2,34 29,50 (27,75; 30,00)	29,00 ± 0,58 29,00 (29,00; 29,00)	30,00 ± 1,10 30,00 (29,00; 30,50)	29,37 ± 0,53 29,05 (29,00; 30,03)	p ⁽¹⁾ = 0,241
CHCM	32,97 ± 0,08 33,00 (32,95; 33,00)	32,96 ± 0,11 33,00 (32,80; 33,00)	33,98 ± 2,46 33,00 (32,95; 34,58)	32,95 ± 0,12 33,00 (32,80; 33,03)	p ⁽¹⁾ = 0,736
Leucócitos	2916,67 ± 238,05 2975,00 (2725,00; 3112,50)	2545,71 ± 319,47 2400,00 (2250,00; 2800,00)	2798,33 ± 441,92 2815,00 (2345,00; 3125,00)	2523,33 ± 229,23 2540,00 (2295,00; 2750,00)	p ⁽¹⁾ = 0,074
Segmentados	36,50 ± 3,78 37,50 (32,50; 39,50)	31,71 ± 4,39 31,00 (28,00; 37,00)	32,17 ± 4,17 32,50 (27,75; 36,25)	30,50 ± 3,21 30,00 (27,75; 33,00)	p ⁽¹⁾ = 0,076
Eosinófilos	1,33 ± 0,52 1,00 (1,00; 2,00)	1,71 ± 0,76 2,00 (1,00; 2,00)	1,17 ± 0,41 1,00 (1,00; 1,25)	1,67 ± 1,03 1,00 (1,00; 3,00)	p ⁽¹⁾ = 0,509
Linfócitos	64,33 ± 4,37 66,00 (59,50; 67,50)	65,14 ± 4,26 66,00 (60,00; 68,00)	63,67 ± 3,88 63,00 (60,00; 67,00)	66,50 ± 3,62 66,00 (64,00; 70,25)	p ⁽¹⁾ = 0,640
Mastócitos	1,17 ± 0,41 1,00 (1,00; 1,25)	1,43 ± 0,53 1,00 (1,00; 2,00)	1,33 ± 0,52 1,00 (1,00; 2,00)	1,33 ± 0,52 1,00 (1,00; 2,00)	p ⁽¹⁾ = 0,802
Plaquetas	521100,00 ± 37353,18 516000,00 (494250,00; 550400,00)	528571,43 ± 46582,75 520000,00 (475000,00; 582000,00)	495666,67 ± 73093,55 486000,00 (420000,00; 581000,00)	475533,33 ± 107302,69 492000,00 (380000,00; 580400,00)	p ⁽¹⁾ = 0,470

(1) Através do teste Kruskal Wallis.

As hemácias e hematócrito foram mais elevadas no grupo G3, o que pode demonstrar que a associação das terapêuticas resultou em um efeito benéfico para a hematopoiese. A hemoglobina foi mais elevada nos grupos G4 e G3. As plaquetas apresentaram valores mais elevados no grupo G2 e menos elevados no grupo G4.

Observa-se que não ocorreram alterações significativas no leucograma, destacam-se as médias do número de leucócitos variaram de 2.798,33 a 2.916,67 nos grupos G1 e G3 e de 2.523,33 a 2.545,71 nos grupos G2 e G4. A média dos segmentados foi mais elevada no grupo G1 (36,50) e variou de 30,50 a 32,17 nos grupos G2, G3 e G4. Com exceção da variável eosinófilos que apresentou desvio padrão superior à metade da média. Todas as demais variáveis apresentaram variabilidade reduzida devido ao desvio padrão inferior a 1/3 das médias correspondentes.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos principais mensageiros do ozônio (O_3) que age no citoplasma das células mononucleares, sendo capaz de ativar uma tirosina quinase, que fosforila uma transcrição do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), permitindo a síntese de diferentes citocinas (Bocci e Paulesu, 1990; Valacchi e Bocci, 2000; Bocci, 2004). Basicamente, o H_2O_2 será um mensageiro atuando nas células mononucleares do sangue (Bocci e Paulesu, 1990; Bocci *et al.*, 1993, 1998; Reth, 2002), plaquetas (Bocci *et al.*, 1999), células endoteliais (Valacchi e Bocci, 2000) e em eritrócitos (Bocci, 2002), através da oxidação de cisteínas (Rhee *et al.*, 2000).

Nos eritrócitos as espécies reativas ao oxigênio (peróxido de hidrogênio em água e lipoperóxidos em hidroperóxidos) são reduzidas, em aproximadamente 10 a 15 minutos, quando se tem a ação de antioxidantes oxidados em forma reduzida. Enquanto a glutathione redutase (GSH-Rd) utiliza o fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADPH - esta coenzima serve como um doador de elétrons para várias reações bioquímicas) para reciclar a glutathione oxidada (GSSG) para o nível original de GSH, o NADP oxidado é reduzido após a ativação da via da pentose fosfato, da qual a glicose 6-fosfato desidrogenase (G-6PD) é a enzima chave. Assim, a glicólise é acelerada com conseqüente aumento dos níveis de ATP (Bocci, 2011b).

Os eritrócitos reinfundidos, por um breve período, aumentam o fornecimento de oxigênio aos tecidos isquêmicos devido a uma ligeira diminuição do pH intracelular (efeito Bohr) e/ou um aumento dos níveis de 2,3 difosfoglicato (2,3-DPG) (Bocci, 2011b).

A cisplatina é classicamente conhecida por apresentar efeitos anticâncer atividade através de danos ao núcleo do DNA, esta substância provoca deficiência de ferro intracelular por meio de inibição direta do regulador mestre do metabolismo do ferro, proteína 2 reguladora do ferro (IRP2) com efeitos no IRP1. Cisplatina, mas não carboplatina ou transplatina, liga IRP2 humano em Cys512 e Cys516 e prejudica a ligação de IRP2 ao ferro responsivo a elementos de ferritina, receptor-1 de transferrina (TfR1) e RNAm (Miyazawa, Bogdan e Tsuj. 2019).

Neste experimento, os resultados não mostraram anemia em nenhum dos grupos estudados divergindo do descrito por Barret-Lee *et al.* (1999), quando uma proporção significativa de pacientes que receberam quimioterapia citotóxica, como a cisplatina, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, topotecam, irinotecam, etoposide e ifosfamida, apresentam anemia grave, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia (Silva, Marcolino e Alves, 2020). Fato que pode ter ocorrido devido ao curto período de tratamento em que os animais foram submetidos.

A Tabela 2 apresenta os resultados estatísticos por grupo do perfil renal e hepático para o nível de significância fixado (5%). Não foram registradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos para as variáveis analisadas.

Tabela 2 – Resultados estatísticos das variáveis relacionadas com o perfil renal e hepático de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos com carcinoma de Ehrlich.

Variável	Grupos				Valor de p
	G1	G2	G3	G4	
	(Controle positivo) Média ± DP Mediana (P25; P75)	(Ozonioterapia) Média ± DP Mediana (P25; P75)	(Ozonioterapia + Cisplatina) Média ± DP Mediana (P25; P75)	(Controle negativo) Média ± DP Mediana (P25; P75)	
Uréia	58,73 ± 7,54 61,00 (50,25; 65,55)	63,76 ± 2,73 63,00 (61,00; 66,20)	61,62 ± 2,90 61,20 (59,50; 63,88)	57,83 ± 6,41 61,10 (50,35; 62,35)	$p^{(1)} = 0,258$
Creatinina	0,40 ± 0,06 0,40 (0,36; 0,44)	0,42 ± 0,04 0,42 (0,40; 0,47)	0,39 ± 0,02 0,39 (0,38; 0,40)	0,39 ± 0,03 0,40 (0,36; 0,41)	$p^{(1)} = 0,230$
ALT/TGO	39,72 ± 3,98 40,10 (36,38; 43,30)	38,66 ± 3,11 38,40 (37,20; 41,80)	37,73 ± 2,96 37,70 (35,50; 39,95)	38,62 ± 2,58 38,50 (36,08; 40,65)	$p^{(1)} = 0,747$
AST/TGP	42,53 ± 4,17 43,15 (38,53; 46,15)	39,19 ± 2,25 40,10 (36,80; 41,00)	38,92 ± 2,56 39,35 (36,05; 41,25)	40,02 ± 2,30 39,20 (38,68; 42,25)	$p^{(1)} = 0,423$

(1) Através do teste Kruskal Wallis.

Apesar dos resultados não significativos, se destaca que a média da uréia variou de 57,83 a 63,76. Observou-se elevação dos valores em todos os grupos quando comparados com os parâmetros referenciais, apresentando valores mais elevados no grupo da G2 e menos elevados no grupo G4. Sugere-se que os tratamentos nos quais os animais foram submetidos não foram prejudiciais aos grupos até o momento da eutanásia. Possivelmente se o tratamento fosse prolongado as alterações hematológicas poderiam ser vistas, assim como descritos pelos autores (Silva, Marcolino e Alves, 2020).

A uréia é o principal produto final nitrogenado do catabolismo de proteínas e aminoácidos, produzida pelo fígado e distribuída por todo o líquido intracelular e extracelular, vai ser filtrada do sangue pelos glomérulos e parcialmente reabsorvida (Corbett, 2008), sendo um pobre indicador da taxa de filtração glomerular, pois sua taxa de superprodução depende

de vários fatores não renais, incluindo dieta e enzimas do ciclo da uréia (Gowda, 2010). O aumento da ureia no sangue pode ser associado a achados de doença renal, falha ou bloqueio do trato urinário, insuficiência cardíaca congestiva, desidratação, febre e choque (Gowda, 2010).

No entanto, a uréia é um marcador inespecífico e é necessário que se avalie conjuntamente com a creatinina sérica. A média da creatinina, variou de 0,39 a 0,42, e foi mais elevada no grupo G2. A creatinina é um produto da decomposição do fosfato de creatina no músculo e geralmente é produzida a uma taxa bastante constante pelo corpo, dependendo da massa muscular (Zuo, 2008), sendo um parâmetro para o cálculo da taxa de filtração glomerular (Miller, 2005).

Observou-se que o efeito protetor desencadeado pela MOO em ratos que fizeram o uso de cisplatina foi relatado nas doses de 20 e 30 mcg/ml, que foram capazes de reduzir tanto a creatinina sérica como a substância reativa do ácido tiobárbiturico (SRATB). Entretanto, neste estudo não foram observadas alterações significativas entre os grupos nas dosagens de uréia e creatinina séricas (Borrego *et al.*, 2004).

Quanto as enzimas hepáticas a média da ALT/TGO variou de 37,73 a 39,72 e a média da AST/TGP variou de 38,92 a 42,53, sendo as duas variáveis mais elevadas no G1 e menos elevada no G3. A variabilidade expressa pelos valores dos desvios padrão se mostrou bastante reduzida uma vez que os referidos valores foram inferiores a 1/3 das médias correspondentes.

O aumento de ALT é considerado específico para determinação de lesão hepática (Jorge, 2006). Processos patológicos diversos podem causar elevações nas enzimas hepáticas, devido à variação na distribuição de cada enzima específica no lóbulo hepático (Henry, 2008).

Estudos em que animais foram submetidos a um pré condicionamento com a MOO demonstraram que o ozônio por via IR reverteu o dano hepático mediante o restabelecimento dos níveis das transaminases e aumento de enzimas antioxidantes como SOD e CAT (León *et al.*, 1998; Ajamieh *et al.*, 2004)

Os traçados dos perfis hematológico, renal e hepático devem ser interpretados cuidadosamente. Recomenda-se que para a adequada interpretação das análises, cada biotério tenha estabelecido os próprios valores de referência das avaliações laboratoriais. Devido à ampla faixa de variação dos parâmetros fisiológicos que podem ser alterados em função das condições em que os animais estão submetidos o que poderia inviabilizar resultados experimentais (Matida, 2015). O sistema hematopoiético é extremamente sensível a atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou

citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanentes, podendo também refletir na atividade imunológica (Lima, 2002).

Na Tabela 3 é possível verificar que as médias do peso foram correspondentemente mais elevadas no grupo Controle negativo do que nos outros grupos e as médias dos outros grupos oscilaram entre si durante o período analisado.

As pesagens diárias foram importantes para a avaliação dos animais quanto a perda ou ganho de peso, o que pode demonstrar as alterações relacionadas a ganho de massa muscular, como pode influenciar nas alterações em marcha devido ao aumento do tumor em membro torácico, o que foi observado principalmente nos animais do grupo G4, em que não houve tratamento. Nos dias D4, D6, D11 e D15 não mostraram diferenças estatísticas significativa entre os grupos o que demonstra um padrão na escolha dos tamanhos dos animais, e nos demais dias houveram diferenças significativas entre grupos.

Ao final do experimento observou-se que a diferença absoluta do peso no primeiro dia (P1) subtraído do peso no último dia (P7), os animais dos grupos G1, G2 e G3 apresentaram diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo G4, o que sinaliza o crescimento acentuado do tumor neste grupo.

Tabela 3 – Resultados estatísticos do peso em modelo experimental de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.

Dia	Grupos				Valor de p
	G1 (Controle positivo)	G2 (Ozonioterapia)	G3 (Ozonioterapia + Cisplatina)	G4 (Controle negativo)	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
D1	37,83 ± 3,34 ^(AB)	40,00 ± 2,18 ^(A)	35,08 ± 2,22 ^(B)	38,25 ± 2,89 ^(AB)	p ⁽¹⁾ = 0,018*
D2	37,92 ± 3,54 ^(A)	39,57 ± 2,15 ^(A)	34,67 ± 2,34 ^(B)	38,58 ± 3,31 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,023*
D3	37,58 ± 3,50 ^(A)	39,29 ± 2,58 ^(A)	34,00 ± 2,35 ^(B)	39,08 ± 2,78 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,018*
D4	37,25 ± 3,17	39,07 ± 2,92	34,75 ± 2,25	38,58 ± 2,91	p ⁽¹⁾ = 0,079
D5	37,42 ± 2,92 ^(AB)	39,71 ± 2,02 ^(A)	34,25 ± 2,02 ^(B)	37,92 ± 3,12 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,017*
D6	38,50 ± 3,67	39,71 ± 2,32	34,83 ± 2,21	37,67 ± 3,25	p ⁽¹⁾ = 0,055
D7	39,67 ± 3,93 ^(A)	39,89 ± 2,11 ^(A)	34,96 ± 2,22 ^(B)	38,42 ± 3,45 ^(AB)	p ⁽¹⁾ = 0,045*
D8	40,75 ± 4,33 ^(A)	40,07 ± 2,09 ^(A)	35,08 ± 2,29 ^(B)	39,17 ± 3,74 ^(AB)	p ⁽¹⁾ = 0,046*
D9	40,25 ± 3,79 ^(A)	40,02 ± 1,75 ^(A)	34,67 ± 2,64 ^(B)	38,33 ± 2,93 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,019*
D10	39,17 ± 4,14 ^(A)	39,04 ± 2,02 ^(A)	34,25 ± 3,01 ^(B)	38,75 ± 3,71 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,042*
D11	38,33 ± 3,44	39,29 ± 1,44	34,17 ± 3,66	39,25 ± 4,47	p ⁽¹⁾ = 0,067
D12	37,83 ± 3,78 ^(AB)	40,64 ± 1,77 ^(A)	34,75 ± 4,13 ^(B)	40,33 ± 4,61 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,022*
D13	37,92 ± 3,67 ^(AC)	40,64 ± 2,30 ^(B)	34,25 ± 4,17 ^(A)	40,33 ± 3,98 ^(BC)	p ⁽¹⁾ = 0,015*
D14	38,42 ± 3,48 ^(AB)	41,68 ± 2,48 ^(A)	35,38 ± 4,23 ^(B)	39,58 ± 3,74 ^(AB)	p ⁽¹⁾ = 0,039*

D15	38,92 ± 3,35	42,71 ± 3,55	36,50 ± 4,37	38,75 ± 3,68	p ⁽¹⁾ = 0,076
D16	38,50 ± 3,21 ^(AB)	41,11 ± 2,08 ^(AC)	35,67 ± 4,07 ^(B)	42,75 ± 3,30 ^(C)	p ⁽¹⁾ = 0,009*
D17	39,92 ± 3,54 ^(AB)	41,14 ± 2,29 ^(AC)	36,17 ± 4,01 ^(B)	45,58 ± 3,99 ^(C)	p ⁽¹⁾ = 0,008*
Diferença absoluta P1 – P17	2,08 ± 3,11 ^(A)	1,14 ± 3,67 ^(A)	1,08 ± 2,46 ^(A)	7,33 ± 3,60 ^(B)	p⁽¹⁾ = 0,009*

(*) Diferença significativa ao nível 5,0%

(1) Através do teste Kruskal Wallis

Obs. Se as letras entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes pelas comparações pareadas do referido teste.

A Tabela 4 apresenta diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no peso do tumor e de cada um dos órgãos analisados. Para estas variáveis se destaca que a média do tumor foi mais elevada no grupo G4 (3,83 g), foi menos elevada no grupo G3 (0,79 g). E essas diferenças significativas foram notadas entre o controle negativo com os demais grupos.

Tabela 4 – Resultados estatísticos do peso do tumor, pulmão, baço, rim e fígado em modelo experimental de camundongos com carcinoma de Ehrlich.

Peso	Grupos				Valor de p
	G1 (Controle positivo)	G2 (Ozonioterapia)	G3 (Ozonioterapia + Cisplatina)	G4 (Controle negativo)	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Tumor	1,54 ± 0,55 ^(A)	1,62 ± 0,53 ^(A)	0,79 ± 0,73 ^(A)	3,83 ± 1,20 ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0,002*
Pulmão	0,31 ± 0,06 ^(AB)	0,32 ± 0,06 ^(A)	0,27 ± 0,03 ^(B)	0,38 ± 0,09 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,037*
Baço	0,39 ± 0,03 ^(A)	0,41 ± 0,07 ^(A)	0,28 ± 0,08 ^(B)	0,54 ± 0,11 ^(C)	p ⁽¹⁾ = 0,002*
Rim	0,46 ± 0,05 ^(A)	0,50 ± 0,05 ^(A)	0,37 ± 0,06 ^(B)	0,49 ± 0,05 ^(A)	p ⁽¹⁾ = 0,008*
Fígado	2,41 ± 0,11 ^(A)	2,96 ± 0,30 ^(B)	2,03 ± 0,20 ^(C)	2,74 ± 0,17 ^(B)	p ⁽¹⁾ < 0,001*

(*) Diferença significativa ao nível 5,0%

(1) Através do teste Kruskal Wallis

Obs. Se as letras entre parênteses são todas distintas, comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes pelas comparações pareadas do referido teste.

A distribuição dos animais foi aleatória, no entanto, observou-se a que o peso dos órgãos no grupo G3 foram menores quando comparado aos demais grupos. O aumento do peso corporal foi notado no grupo controle negativo e observou-se aumento do peso dos órgãos também em relação aos demais grupos. Foi verificado que os grupos G1, G2 e G3 apresentaram redução significativa do tamanho do tumor quando comparados com o grupo G4 (Gráfico 1), resultado que corrobora com o citado por outros autores sobre a ação adjuvante da ozonioterapia no tratamento de tumores (Waked, Nagib e Omar 2013).

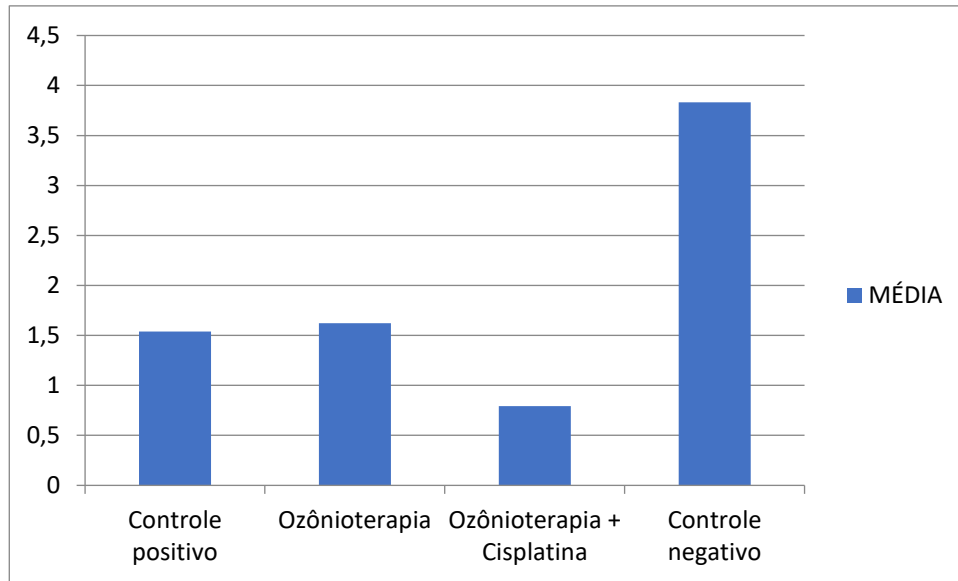


Gráfico 1 - Peso do tumor em gramas de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos com carcinoma de Ehrlich.

Os efeitos biológicos do ozônio não estão relacionados a uma membrana específica ou receptor intracelular, na verdade, ele atua como indutor de estresse oxidativo primeiro em antioxidantes e ácidos graxos poliinsaturados de membrana (PUFA) em um processo denominado peroxidação lipídica (Sagai e Bocci, 2011). Este mecanismo leva a uma produção de segundos mensageiros chamados peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e aldeídos, principalmente 4-hidroxinonal (4-HNE), ambos capazes também de ativar o sistema nuclear fator derivado de eritróide 2 (Nrf2). Ativação que determina efeitos antioxidantes e antiinflamatórios com base principalmente na indução de superóxido dismutase, glutatona-peroxidase, proteínas de choque térmico (HSP-70) e heme oxigenase-1 (HO-1) (Bocci, 2009; Bocci, 2011a).

Em relação ao efeito antiinflamatório do ozônio, pode estar relacionado ao Nrf2 que pode levar à supressão do fator nuclear kappa B (NF B), que é o mais importante fator de transcrição envolvido em vários metabolismos inflamatórios, bem como do câncer (Simonetti *et al.*, 2017).

Estudos relacionados ao uso do ozônio no tratamento anticancer mostram do ponto de vista molecular vários mecanismos de ação envolvendo o Nrf2. A ativação de Nrf2 realizada pelo ozônio pode aumentar a atividade de várias proteínas supressoras de tumor como SOD, catalase (CAT), GSH, GPx, GSH-S-transferase (GSTr), NADPH quinino-oxidoreductase 1 (NQO1) e calor proteína de choque 70 (HSP70). Efeitos substancialmente comparáveis aos observados com o uso de sulforafano, uma molécula natural comum encontrada em brócolis e

outros vegetais verdes, ou curcumina com interesse nas atividades anticâncer em particular relacionadas à quimioprevenção do câncer de mama (Vecchione *et al.*, 2016; Yucel *et al.*, 2015).

A ação da associação do uso do ozônio em estudo *in vitro* demonstra que nas concentrações de 20mcg com agentes quimioterápicos no tratamentos de celulas tumorais, demonstram que há uma significativa diminuição da viabilidade de celulas tumorais, pois reduziram a magnitude do aumento de IL-8, IL-6, e os níveis celulares de IL1- β aproximadamente em 16, 10 e 21%, sugerindo que este seja um possivel tratamento anticâncer (Simonetti *et al.*, 2017). A ozonoterapia atua na oxigenação dos tecidos hipoxicos como possível adjuvante em regimes de quimio-radioterapia (Clavo *et al.*, 2018). A diminuição do tamanho do tumor no grupo G3 ocorreu possivelmente pelo aumento da perfusão do quimioterápico pelo tecido devido a melhor oxigenação proporcionada pelo uso do ozônio via retal.

As vias de aplicação retal e intratumoral são relatadas por Avilés, Rojo e Rosário (2016) na diminuição do tamanho de massa tumoral em cães, no mesmo estudo autores mostram outros casos em que a ozonioterapia mostrou-se importante para a melhora da qualidade de vida de pacientes oncológicos caninos, tanto auxiliando a terapêutica tradicional, como em paciente que não foi submetido a ciclos de quimioterapia e permaneceu em remissão do linfossarcoma 30 meses após o diagnóstico.

Observa-se que o grupo G2 submetido apenas a ozonioterapia apresentou redução significativa do tamanho do tumor, quando comparado com o grupo G4 (controle negativo). Resultado importante para mostrar que o ozônio por via insuflação retal possui ações sistêmicas que vão influenciar impedindo o desenvolvimento do tumor.

Com relação à média de peso do pulmão foi mais elevada no grupo G4 (0,38 g), menos elevada no grupo G3 (0,27 g), variou de 0,31 a 0,32g. A média do peso do baço foi mais elevada no grupo G4 (0,54 g), menos elevada no grupo G3 (0,28 g), variou de 0,39 a 0,41g nos grupos G1 e G2 e as diferenças significativas ocorreram entre o grupo G3 com cada um dos outros três grupos. A redução do peso do baço nos grupos G1 e G3 pode indicar efeito imunossupressor da cisplatina (Dias, 2018).

A média do peso do rim foi menos elevada no grupo G3 (0,37 g) e variou de 0,46 a 0,50 g. Nos demais grupos foram registradas diferenças significativas entre o grupo G3, observou-se que a maior média do peso dos rins foi no grupo G2. Quanto a média do peso do fígado no grupo G1 se comprova diferenças significativas entre os grupos G2, G3 e G4.

Foram observadas médias menos elevada no grupo G3 (2,03 g) e mais elevada no grupo G2 (2,96 g), seguida do grupo G4 (2,74 g).

Nos gráficos 3 e 4 são apresentadas as curvas de comportamento de acordo com o grupo das médias de ingestão de ração e água por dia, respectivamente.

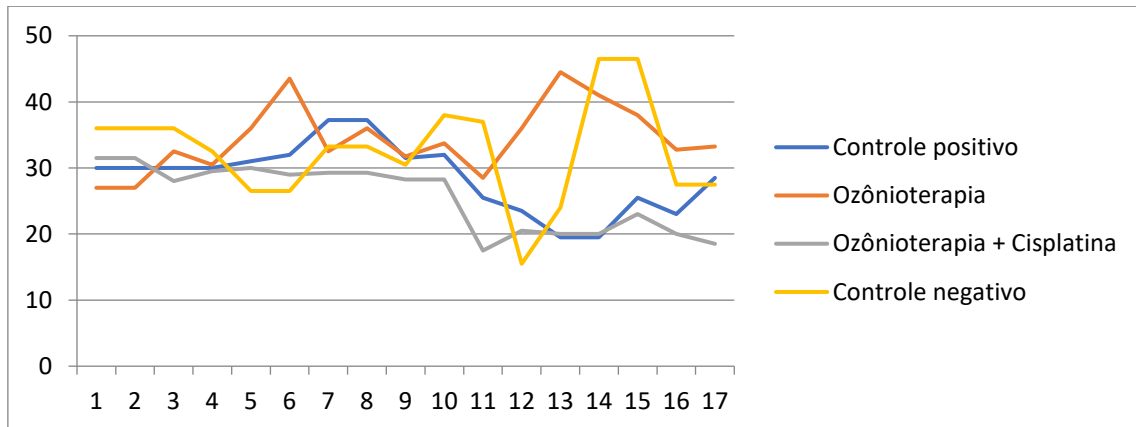


Gráfico 2 - Média do consumo de alimento (g) por dia de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos Ibinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.

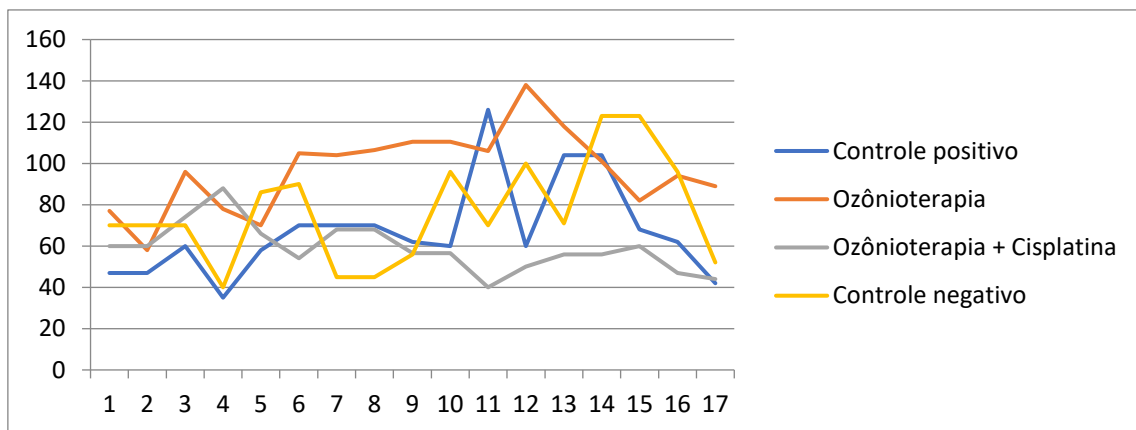


Gráfico 3 - Média da ingestão de água (ml) por dia de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos Ibinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.

Observa-se que os grupos que não receberam cisplatina G2 e G4 apresentaram maior consumo de ração, e que o grupo G2 que recebeu apenas a ozônioterapia por via insuflação retal apresentou maior consumo de alimentos em relação aos demais animais.

Quanto à ingestão de água nota-se que o grupo G3 apresentou menores variações de ingestão durante o tratamento diferente dos demais grupos. No grupo G1, que recebeu apenas

cisplatina, observa-se que a ingestão de água aumentou a partir do 10º dia equivalente ao primeiro dia de tratamento com a cisplatina.

As Tabelas 5 a 8 apresentam os resultados das alterações histopatológicas no tumor, no rim, no fígado, no rim, no baço e no pulmão, as quais não foram registradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as variáveis analisadas.

Na Tabela 5 ressalta-se que na variável necrose de coagulação foram registradas as categorias discreta, moderada e intensa e as maiores diferenças ocorreram no grupo G3 (Ozonioterapia + Cisplatina) com 4 animais na categoria discreta. No grupo G4 (Controle negativo) com 4 animais na categoria intensa e zero na categoria discreta. Observou-se que nos grupos G1, G2 e G4 há uma maior área de necrose de coagulação e a presença de grandes zonas de necrose em feixes.

O carcinoma de Ehrlich é um tumor de alta malignidade e crescimento rápido (Segura, Barbero e Márquez, 2000), como pode ser visto através da grande incidência de necrose nos grupos, observou-se que o tumor no grupo G3 apresentou menores zonas de necrose que podem estar associadas a uma melhor oxigenação, auxiliando desta forma na perfusão da quimioterapia pelo tecido, assim como é descrito por Clavo (2018).

No estudo do tecido adiposo foi registrado um animal do grupo G3 no grau intenso. A maioria (64,0%) foi na categoria discreta e os casos de ausência variou de um a dois animais por grupo. Na variável anisocitose e anisocariose, todos os animais dos 4 grupos foram classificados na categoria intensa. Esse comportamento pode estar diretamente associado ao crescimento e desenvolvimento do tumor no grupo G3 constituído por células na maioria arredondadas em arranjo de cordões que se infiltram por meio do tecido adiposo. O que difere das características celulares observadas nos tumores dos demais grupos. Em relação aos tratamentos o grupo G3 apresentou resultado mais promissores pois aparentemente o tumor teve menor desenvolvimento, para tanto se considerou a presença de tecido adiposo em meio a massa tumoral.

Na avaliação da hemorragia G1 e G3 apresentaram ausência com 84,0%, o que pode indicar que houve uma melhor resposta ao tratamento nestes dois grupos. Quanto a vascularização, prevaleceram as categorias ausência 66,7% nos grupos G3 e G4 e intensa 66,7% no Grupo G1, a neovascularização, entretanto está classicamente presente em processos inflamatórios, e já descrita como uma alteração fundamental para o desenvolvimento tumoral (Onuchic e Chammas, 2010).

Tabela 5 – Avaliação das alterações histopatológicas no tumor de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos lbinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.

Tumor	Grupo				Grupo total n (%)	Valor p
	G1 (Controle positivo) n (%)	G2 (Ozonioterapia) n (%)	G3 (Ozonioterapia + Cisplatina) n (%)	G4 (Controle negativo) n (%)		
Total	6 (100,0)	7 (100,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	25 (100,0)	
Necrose de coagulação						p ⁽¹⁾ = 0,290
Discreta	1 (16,7)	2 (28,6)	1 (16,7)	-	4 (16,0)	
Moderada	3 (50,0)	3 (42,9)	4 (66,7)	2 (33,3)	12 (48,0)	
Intensa	2 (33,3)	2 (28,6)	1 (16,7)	4 (66,7)	9 (36,0)	
Hemorragia						p ⁽¹⁾ = 0,495
Ausência	5 (83,3)	7 (100,0)	5 (83,3)	4 (66,7)	21 (84,0)	
Discreta	-	-	1 (16,7)	2 (33,3)	3 (12,0)	
Moderada	1 (16,7)	-	-	-	1 (4,0)	
Tecido adiposo						p ⁽¹⁾ = 0,277
Ausência	1 (16,7)	1 (14,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	5 (20,0)	
Discreta	5 (83,3)	5 (71,4)	2 (33,3)	4 (66,7)	16 (64,0)	
Moderada	-	1 (14,3)	2 (33,3)	-	3 (12,0)	
Intensa	-	-	1 (16,7)	-	1 (4,0)	
Anisocitose/Anisocariose						p ⁽¹⁾ = 1,000
Intensa	6 (100,0)	7 (100,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	25 (100,0)	
Vascularização						p ⁽¹⁾ = 0,222
Ausência	-	4 (57,1)	4 (66,7)	4 (66,7)	12 (48,0)	
Discreta	2 (33,3)	-	-	-	2 (8,0)	
Intensa	4 (66,7)	3 (42,9)	2 (33,3)	2 (33,3)	11 (44,0)	

(1) Através do teste Kruskal Wallis

As alterações histopatológicas rim estão descritas na Tabela 6 e registradas as 4 categorias: ausência, discreta, moderada e intensa. Todos os grupos apresentaram degeneração vacuolar do epitélio tubular renal, também foram observadas vacuolização e congestão dos tufos glomerulares nos grupos G1, G2 e G4. O grupo G3 apresentou uma vacuolização tubular e glomerular discretas (66,7%). Foram observados nos grupos a presença de cilindros hialinos e hemorragia.

Observa-se nesta pesquisa que os animais do grupo G3 apresentaram menos alterações quanto ao epitélio renal em relação ao grupo G1, esse efeito pode ter relação com o que já foi elucidado em estudos pré-clínicos, demonstrado que o pré-condicionamento oxidativo com ozônio exerce efeito protetor na nefrotoxicidade aguda induzida por cisplatina em ratos (Borrego *et al.*, 2004). Além disso a ozonioterapia tem se apresentado como uma importante aliada no tratamento de doença renal aguda e crônica (Rodríguez, 2017).

Quanto as alterações histopatológicas o grupo G1 tratado com cisplatina apresentou congestão de moderada (50%) e intensa (16,6%) além da presença de tumefação celular do

epitélio tubular moderada e tumefação tubular intensa, o grupo tratado com cisplatina e ozônio apresentou vacuolização e hemorragias moderadas, corroborando com o resultado encontrado por Borrego *et al.* (2004).

Quanto a variável presença de metástase foram identificados dois animais no grupo G1 (Controle positivo) e três no grupo G4 (Controle negativo) e os demais grupos foram considerados com ausência.

Tabela 6 – Avaliação das alterações histopatológicas no rim de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos lbinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.

Rim	Grupo				Grupo total n (%)	Valor p
	G1 (Controle positivo) n (%)	G2 (Ozonioterapia) n (%)	G3 (Ozonioterapia + Cisplatina) n (%)	G4 (Controle negativo) n (%)		
Total	6 (100,0)	7 (100,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	25 (100,0)	
Congestão						p ⁽¹⁾ = 0,336
Ausência	1 (16,7)	-	2 (33,3)	1 (16,7)	4 (16,0)	
Discreta	1 (16,7)	3 (42,9)	2 (33,3)	3 (50,0)	9 (36,0)	
Moderada	3 (50,0)	2 (28,6)	2 (33,3)	2 (33,3)	9 (36,0)	
Intensa	1 (16,7)	2 (28,6)	-	-	3 (12,0)	
Vacuolização						p ⁽¹⁾ = 0,154
Ausência	2 (33,3)	1 (14,3)	2 (33,3)	4 (66,7)	9 (36,0)	
Discreta	2 (33,3)	2 (28,6)	4 (66,7)	1 (16,7)	9 (36,0)	
Moderada	1 (16,7)	2 (28,6)	-	1 (16,7)	4 (16,0)	
Intensa	1 (16,7)	2 (28,6)	-	-	3 (12,0)	
Necrose de coagulação						p ⁽¹⁾ = 0,871
Ausência	4 (66,7)	5 (71,4)	4 (66,7)	5 (83,3)	18 (72,0)	
Discreta	-	2 (28,6)	1 (16,7)	-	3 (12,0)	
Moderada	1 (16,7)	-	-	1 (16,7)	2 (8,0)	
Intensa	1 (16,7)	-	1 (16,7)	-	2 (8,0)	
Hemorragia						p ⁽¹⁾ = 0,960
Ausência	3 (50,0)	3 (42,9)	-	2 (33,3)	8 (32,0)	
Discreta	-	-	3 (50,0)	-	3 (12,0)	
Moderada	2 (33,3)	2 (28,6)	3 (50,0)	3 (50,0)	10 (40,0)	
Intensa	1 (16,7)	2 (28,6)	-	1 (16,7)	4 (16,0)	
Metástase						p ⁽¹⁾ = 0,072
Ausência	4 (66,7)	7 (100,0)	6 (100,0)	3 (50,0)	20 (80,0)	
Presença	2 (33,3)	-	-	3 (50,0)	5 (20,0)	
Tumefação celular						p ⁽¹⁾ = 0,520
Ausência	-	-	1 (16,7)	-	1 (4,0)	
Discreta	2 (33,3)	3 (42,9)	3 (50,0)	1 (16,7)	9 (36,0)	
Moderada	2 (33,3)	2 (28,6)	1 (16,7)	4 (66,7)	9 (36,0)	
Intensa	2 (33,3)	2 (28,6)	1 (16,7)	1 (16,7)	6 (24,0)	

(1) Através do teste Kruskal Wallis

A Tabela 7 apresenta os resultados das alterações no fígado e no baço. As principais alterações associadas ao Fígado foram congestão discreta 12% dos animais, necrose de coagulação moderada em 24% dos animais, metástase em 28% dos animais, tumefação celular foi moderada em 52,0% dos animais. No baço a maioria dos animais 52% apresentou

congestão moderada, 28% na categoria discreta. A presença de metástase variou de um a dois casos por grupo. Apenas três animais foram considerados com ausência de atrofia de folículos linfóides e as categorias moderada, intensa e discreta tiveram percentuais respectivos de 44,0%, 24,0% e 20,0%.

Em geral observou-se no fígado a presença de áreas de acidofilia citoplasmática, vacuolização difusa dos hepatócitos, presença de alguns trombos hialinos. Nos grupos G1, G2 e G4 observou-se necrose de coagulação.

A absorção da MOO por via IR tem a ação direta sob o fígado, auxiliando no funcionamento. Diversos trabalhos mostram a redução do dano hepático através do pré-condicionamento oxidativo com ozônio sendo relatadas as vias intraperitoneal, solução salina intravenosa e IR em modelos experimentais de roedores, que proporcionam, portanto, o efeito hepatoprotetor pode ser atingido através da indução de resposta antioxidante endógena, influenciada pelo aumento da transcrição do fator Nrf2 para a expressão das enzimas antioxidantes, CAT, SOD, GPx (Rodriguez, 2017). Nesta pesquisa não foi possível observar os efeitos benéficos do ozônio no órgão, pois em todos os grupos foram observadas alterações semelhantes excetuando as áreas de necrose de coagulação que foram mais discretas nos animais do grupo G3.

No baço os animais do grupo G3 apresentaram menores áreas de congestão, menor índice de metástase e atrofia dos folículos linfóides.

Tabela 7 – Avaliação das alterações histopatológicas no fígado e baço de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos Ibinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.

Variável	Grupos				Grupo total n (%)	Valor p
	G1 (Controle positivo) n (%)	G2 (Ozonioterapia) n (%)	G3 (Ozonioterapia + Cisplatina) n (%)	G4 (Controle negativo) n (%)		
Total	6 (100,0)	7 (100,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	25 (100,0)	
Fígado						
Congestão						p ⁽¹⁾ = 0,788
Ausência	6 (100,0)	6 (85,7)	5 (83,3)	5 (83,3)	22 (88,0)	
Discreta	-	1 (14,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	3 (12,0)	
Vacuolização						p ⁽¹⁾ = 0,237
Ausência	6 (100,0)	5 (71,4)	6 (100,0)	4 (66,7)	21 (84,0)	
Discreta	-	1 (14,3)	-	-	1 (4,0)	
Moderada	-	-	-	2 (33,3)	2 (8,0)	
Intensa	-	1 (14,3)	-	-	1 (4,0)	
Necrose de coagulação						p ⁽¹⁾ = 0,089
Ausência	2 (33,3)	2 (28,6)	5 (83,3)	5 (83,3)	14 (56,0)	
Discreta	2 (33,3)	-	-	-	2 (8,0)	
Moderada	-	4 (57,1)	1 (16,7)	1 (16,7)	6 (24,0)	

Intensa	2 (33,3)	1 (14,3)	-	-	3 (12,0)	
Hemorragia						$p^{(1)} = 1,000$
Ausência	6 (100,0)	7 (100,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	25 (100,0)	
Metástase						$p^{(1)} = 0,671$
Ausência	5 (83,3)	4 (57,1)	4 (66,7)	5 (83,3)	18 (72,0)	
Presença	1 (16,7)	3 (42,9)	2 (33,3)	1 (16,7)	7 (28,0)	
Tumefação celular						$p^{(1)} = 0,777$
Ausência	1 (16,7)	2 (28,6)	-	2 (33,3)	5 (20,0)	
Discreta	2 (33,3)	-	1 (16,7)	-	3 (12,0)	
Moderada	1 (16,7)	4 (57,1)	4 (66,7)	4 (66,7)	13 (52,0)	
Intensa	2 (33,3)	1 (14,3)	1 (16,7)	-	4 (16,0)	
Baço						
Congestão						$p^{(1)} = 0,096$
Ausência	-	1 (14,3)	1 (16,7)	-	2 (8,0)	
Discreta	-	1 (14,3)	2 (33,3)	4 (66,7)	7 (28,0)	
Moderada	4 (66,7)	5 (71,4)	2 (33,3)	2 (33,3)	13 (52,0)	
Intensa	2 (33,3)	-	1 (16,7)	-	3 (12,0)	
Metástase						$p^{(1)} = 0,875$
Ausência	5 (83,3)	5 (71,4)	5 (83,3)	4 (66,7)	19 (76,0)	
Presença	1 (16,7)	2 (28,6)	1 (16,7)	2 (33,3)	6 (24,0)	
Atrofia de folículos						$p^{(1)} = 0,108$
Linfoides						
Ausência	1 (16,7)	-	1 (16,7)	1 (16,7)	3 (12,0)	
Discreta	-	1 (14,3)	3 (50,0)	1 (16,7)	5 (20,0)	
Moderada	1 (16,7)	5 (71,4)	2 (33,3)	3 (50,0)	11 (44,0)	
Intensa	4 (66,7)	1 (14,3)	-	1 (16,7)	6 (24,0)	

(1) Através do teste Kruskal-Wallis.

As alterações histopatológicas do pulmão estão apresentadas na Tabela 8, onde foi observado congestão, hemorragia, metástase pneumonia e enfisema pulmonar, nas categorias ausente, discreta, moderada e intensa. Ressalta-se que 88,0% com congestão moderada, 78,0% com ausência de hemorragia, as maiores frequências foram evidenciadas nos grupos G4 Controle negativo (100,0%) e grupo G1 Controle positivo (66,7%);

Metástases foram visualizadas em todos os grupos sendo mais elevada no grupo da ozonioterapia (71,4%) e menos elevado nos Grupos G1 e G3.

A ausência da pneumonia foi 68,0%, sendo em 24,0% correspondeu a presença moderada. A maioria 88,0% tiveram ausência de enfisema intersticial e as categorias discreta e moderada tiveram frequências que variaram de zero a um nos grupos. A pneumonia pode ser associada as condições ambientais. Como citado por Seamer (1981), pode ocorrer a inoculação de patógenos indiretamente através da inalação da poeira originaria das gaiolas e camas dos animais.

Tabela 8 – Avaliação das alterações histopatológicas no pulmão de acordo com o grupo em modelo experimental de camundongos Ibinos Swiss (*Mus musculus*) com carcinoma de Ehrlich.

Grupo

Pulmão	G1 (Controle positivo) n (%)	G2 (Ozonioterapia) n (%)	G3 (Ozonioterapia + Cisplatina) n (%)	G4 (Controle negativo) n (%)	Grupo total n (%)	Valor p
Total	6 (100,0)	7 (100,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	25 (100,0)	
Congestão						$p^{(1)} = 0,139$
Ausência	-	1 (14,3)	-	1 (16,7)	2 (8,0)	
Discreta	1 (16,7)	-	1 (16,7)	3 (50,0)	5 (20,0)	
Moderada	5 (83,3)	6 (85,7)	4 (66,7)	2 (33,3)	17 (68,0)	
Intensa	-	-	1 (16,7)	-	1 (4,0)	
Hemorragia						$p^{(1)} = 0,280$
Ausência	4 (66,7)	4 (57,1)	5 (83,3)	6 (100,0)	19 (76,0)	
Discreta	-	1 (14,3)	1 (16,7)	-	2 (8,0)	
Moderada	2 (33,3)	2 (28,6)	-	-	4 (16,0)	
Metástase						$p^{(1)} = 0,132$
Ausência	5 (83,3)	2 (28,6)	5 (83,3)	3 (50,0)	15 (60,0)	
Presença	1 (16,7)	5 (71,4)	1 (16,7)	3 (50,0)	10 (40,0)	
Pneumonia						$p^{(1)} = 0,997$
Ausência	4 (66,7)	5 (71,4)	4 (66,7)	4 (66,7)	17 (68,0)	
Discreta	1 (16,7)	-	1 (16,7)	-	2 (8,0)	
Moderada	1 (16,7)	2 (28,6)	1 (16,7)	2 (33,3)	6 (24,0)	
Enfisema intersticial						$p^{(1)} = 0,733$
Ausência	5 (83,3)	7 (100,0)	5 (83,3)	5 (83,3)	22 (88,0)	
Discreta	1 (16,7)	-	1 (16,7)	-	2 (8,0)	
Moderada	-	-	-	1 (16,7)	1 (4,0)	

(1) Através do teste de Kruskal-Wallis

Observou-se que os animais dos grupos G2 e G4 apresentaram mais focos de metástase, quando comparados com os grupos G1 e G3. Diferente desse resultado foi observado que grupo de camundongos tratados apenas com ozomolmolenioterapia em dois estudos simultaneos com altas concentrações de ozônio apresentaram em ambos os tumores tratados, uma diminuição significativa no número de metástases pulmonares, com menor número de células tumorais por camundongo em maiores concentrações de ozônio (Menendéz, Cepero e Borrego 2008). Entretanto, observa-se que houve uma regressão significativa no tamanho do tumor do grupo G2 com a concentração de 20mcg/ml.

A ozonoterapia tem como um dos principais fatores o impacto na oxigenação dos tecidos, podendo aumentar a oxigenação em vários tecidos tumorais hipóxicos e pode ser útil como possível adjuvante em regimes de quimio-radioterapia (Clavo et al., 2018). A diminuição do tamanho do tumor no grupo G3 ocorreu possivelmente pelo aumento da perfusão do quimioterápico pelo tecido devido a melhor oxigenação proporcionada pelo uso do ozônio via retal.

As Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 apresentam os cortes histopatológicos dos tumores, fígado, rim, baço e pulmão em que foi observado a presença de metástase. Os exames histopatológicos permitiram que fossem observados os detalhes celulares e avaliação do tecido neoplásico, assim como a anisocitose e anisocariose, além de alterações como as mudanças da morfologia dos tecidos renal, hepático pulmonar e esplênico, assim como pode se evidenciar as invasões teciduais e a presenças de comportamento metastático por meio da presença de células tumorais encontradas em vasos linfáticos ou sanguíneos e tecidos adjacentes aos órgãos (Sanches, Torres e Guerra, 2015).

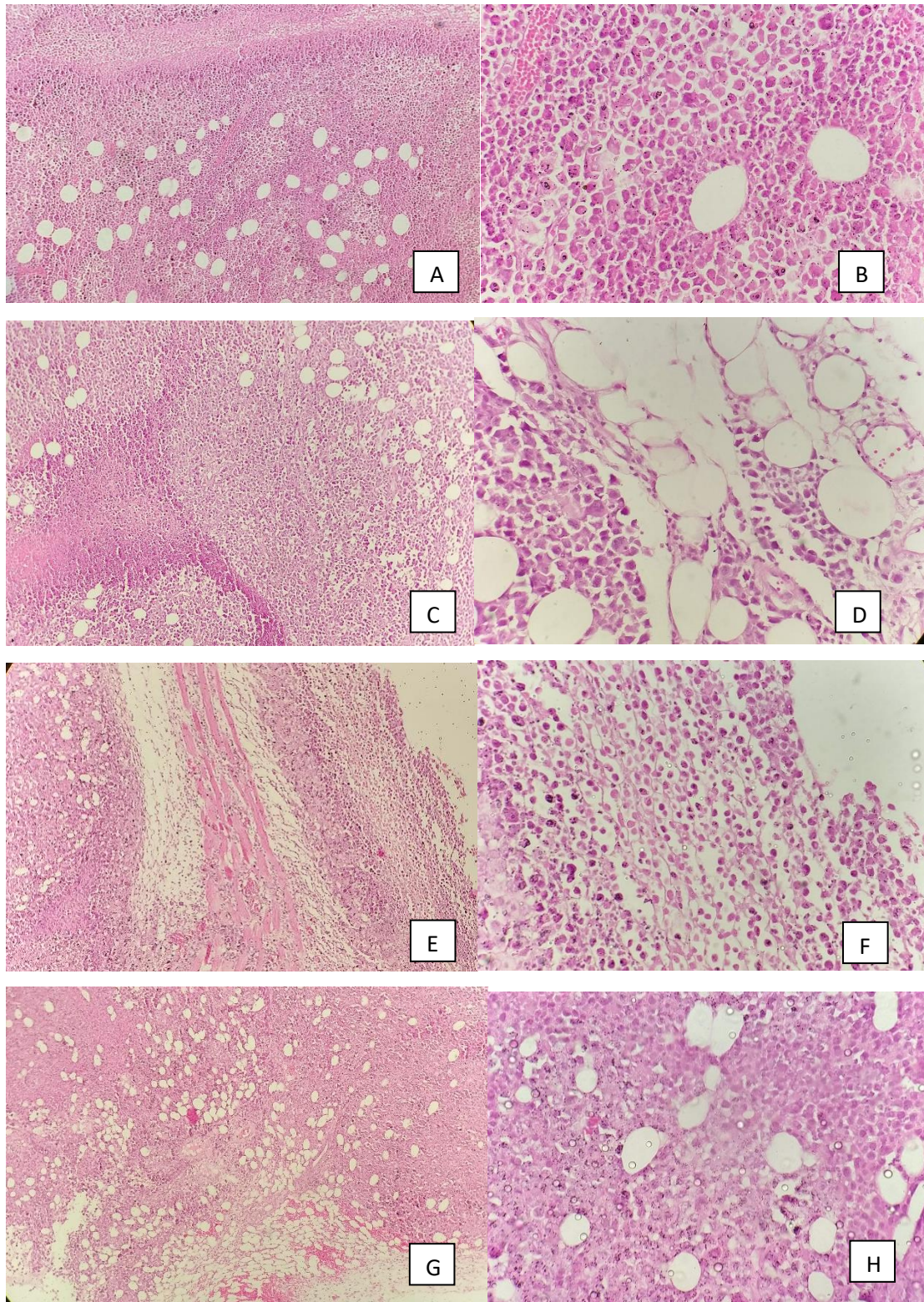


Figura 1 – (A) Corte histológico do tumor do grupo G1, tumor mimetiza septações na parte central, entremeado por vacúolos grandes e bem definidos, H&E, 100X. B – Corte histológico do tumor do grupo G1, H&E, 400X. (C) Corte histológico do tumor do grupo G2 infiltração do tumor no tecido adiposo periférico, H&E, 100X. (D) Corte histológico do tumor do grupo G2, H&E, 400X. (E) Corte histológico do tumor do grupo G3 fragmento de tumor em uma das extremidades apresenta feixe de

músculo e zonas de necrose de coagulação, H&E, 100X. (F) Corte histológico do tumor do grupo G3 fragmento de tumor em uma das extremidades, H&E, 400X. (G) Corte histológico do tumor do grupo G4 extensa necrose disposta sempre de forma de feixes e hemorragia. Periféricamente tumor mais ativo, H&E, 100X. (H) Corte histológico do tumor do grupo G4, H&E, 400X.

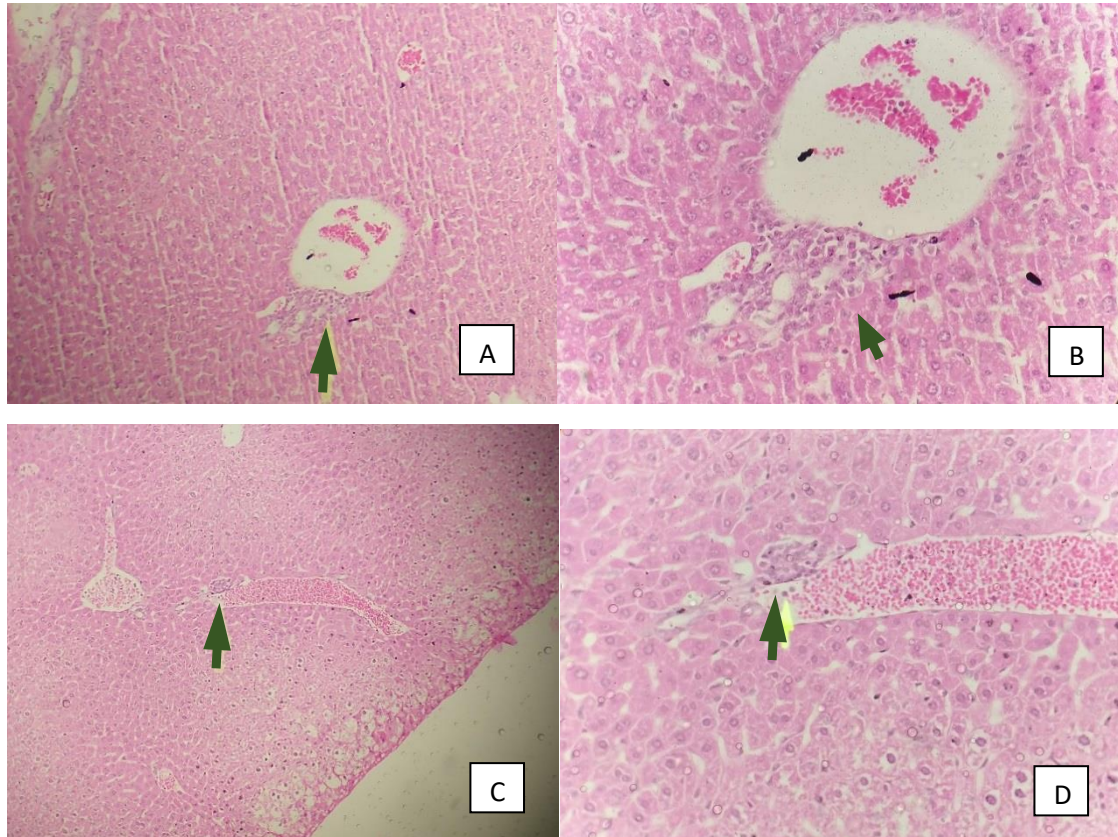


Figura 2 - (A) Corte histológico do fígado de animal do grupo G1 com foco de metástase (seta), junto a um ramo da veia porta. H&E, 100X. (B) Foco de metástase (seta), junto a um ramo da veia porta. H&E, 250X. (C) Corte histológico de fígado do Grupo G3 com presença de um foco metástase (Seta) localizada próxima a um vaso, H&E, 100X. (D) Grupo G3 com presença de um foco metástase (Seta), H&E, 400X.

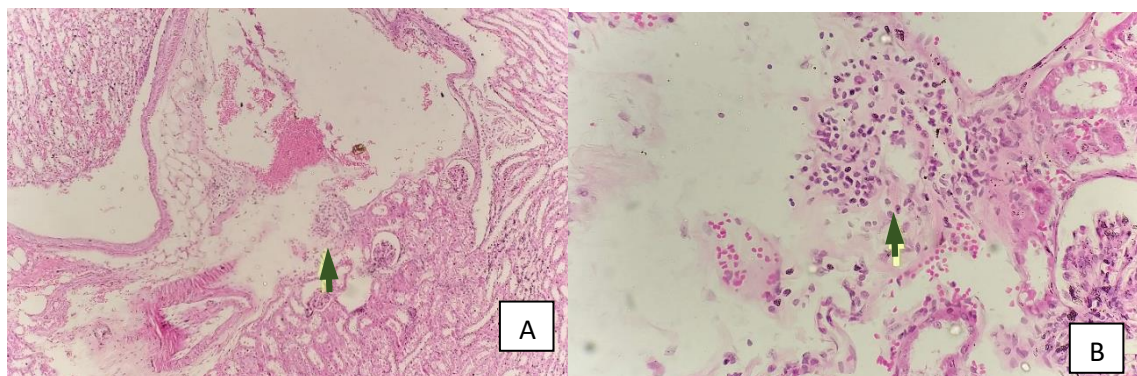


Figura 3 - (A) Corte histológico do rim de animal do grupo G4 com metástase em hilo renal. H&E, 100X. (B) Corte histológico do rim com metástase em hilo renal. H&E, 400X.

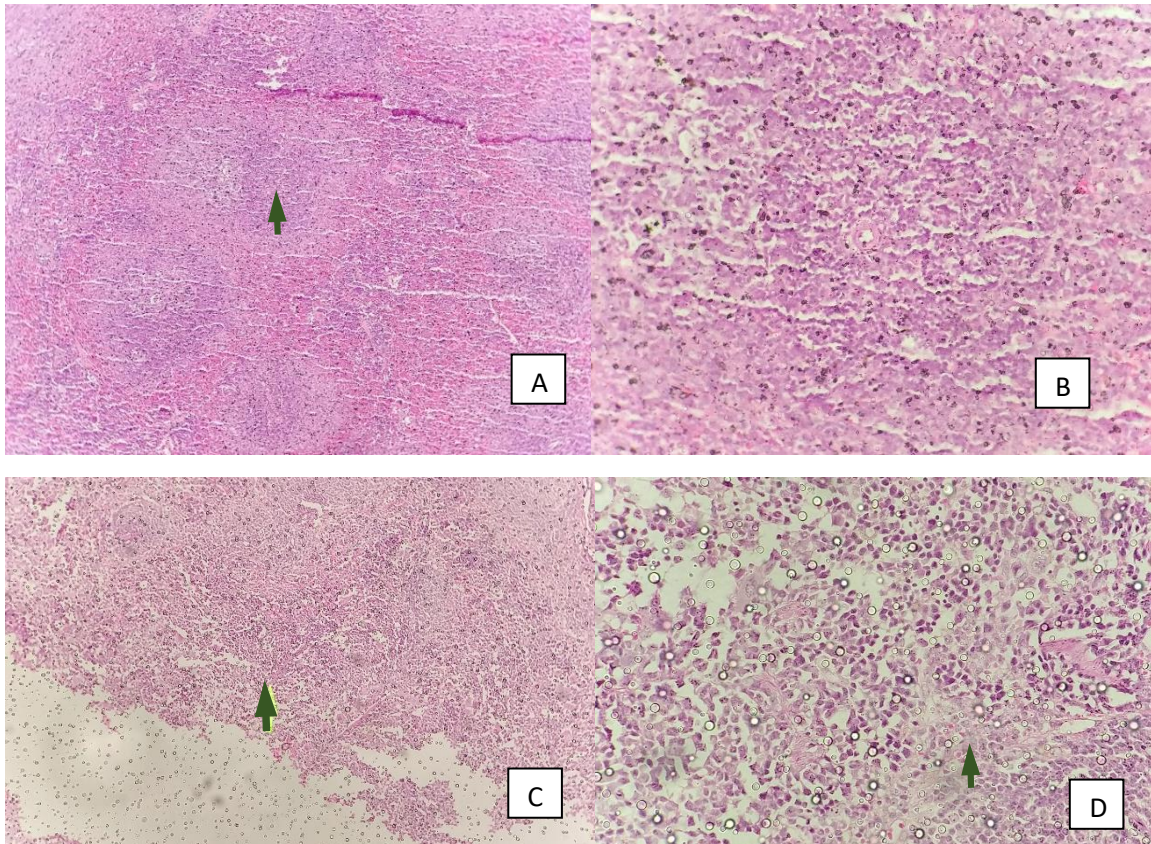


Figura 4 – (A) Corte histológico do baço G1 (CM) com rarefação dos elementos linfocitários, atrofia de folículos linfóides (seta). H&E, 100X. (B) Corte histológico do baço com rarefação dos elementos linfocitários. H&E, 400X. (C) Corte histológico do baço grupo G3 pouco celularizado, e atrofia dos folículos linfóides, com presença de metástase (seta). H&E, 100X. (D) Corte histológico do baço G3 com rarefação dos elementos linfocitários, metástase (Seta). (D) Corte histológico do baço com presença de células tumorais H&E, 400X.

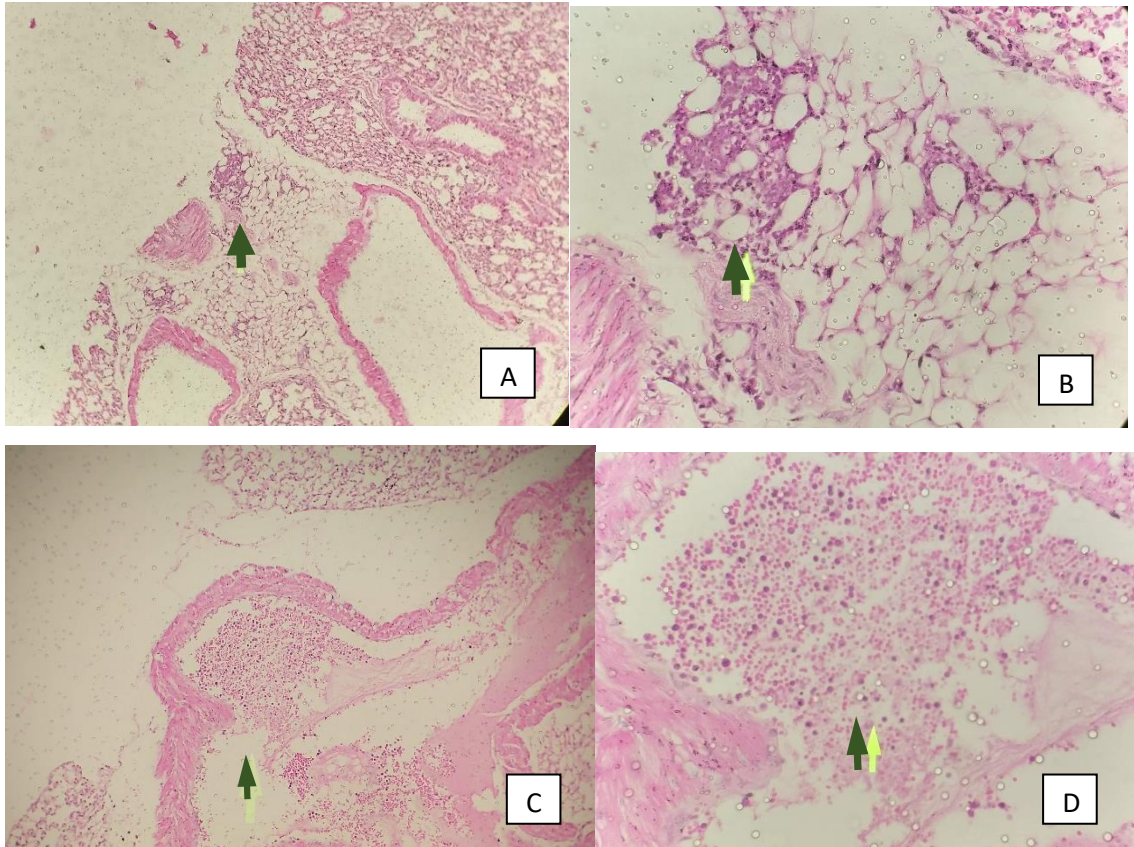


Figura 5 – (A) Corte histológico do pulmão do Grupo G4 apresentando congestão moderada, observa-se metástase, com células predominantemente arredondadas no tecido adiposo. H&E, 100X. (B) Metástase em pulmão Grupo G4, H&E, 400X. (C) Corte histológico de pulmão do Grupo G3, embolo de células tumorais no interior de artéria pulmonar, H&E, 100X. (D) Embolo de células tumorais no interior de artéria pulmonar, grupo G3. H&E, 400X.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que de acordo com os resultados a ozonioterapia associada a cisplatina demonstrou ser o tratamento em que os camundongos com carcinoma de Erhlich apresentaram o menor peso do tumor. As ações terapêuticas no grupo tratado apenas com ozonioterapia proporcionaram aumento no consumo do alimento, como também, uma atividade antitumoral semelhante ao grupo tratado apenas com cisplatina.

Salienta-se que um tempo maior de tratamento seria importante para comprovar os resultados apresentados neste experimento. Porém, não foi possível diante do protocolo adotado no laboratório experimental com foco nos princípios adotados pela ciência do bem-estar animal. Perspectivas futuras de uma continuação deste estudo ficam sugeridas, como forma de tornar a ozonioterapia uma forte aliada à ciência e à saúde.

7 REFERÊNCIAS

Adams, V.J.; Evans, K.M.; Sampson, J.; Wood, J.L.N. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. **Journal of Small Animal Practice**, v. 51, n. 10, p. 512-524, 2010.

Ajamieh, H.H.; Berlanga, J.; Merino, N.; Sánchez, G.M.; Carmona, A.M.; Cepero, S.M.; Giuliani, A.; Re, L.; O.S. León. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/ reperfusion. **Transplant international**, v. 18, n. 5, p. 604-612, 2005.

Ajamieh, H.H.; Menéndez, S.; Martínez-Sánchez, G.; Candelario-Jalil, E.; Re, L.; Giuliani, A.; Fernández, O.S.L. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia–reperfusion. **Liver International**. v. 24, n. 1, p. 55-62, 2004.

Altinok Yipel, F.; Abuzer, A. ; Mustafa, Y. Effect of some essential oils (*Allium sativum* L., *Origanum majorana* L.) and ozonated olive oil on the treatment of ear mites (*Otodectes cynotis*) in cats. Turkish. **Veterinary and Animal Sciences**, v. 40, n. 6, p. 782-787, 2016.

Andrade, R.L.; Oliveira, D.M.; Dantas, A.F.M.; de Souza, A.P.; Nóbrega Neto, P. I.; Riet-Correa, F. Tumores de cães e gatos diagnosticados no Semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.10, p.1037-1040, 2012.

Avilés M. H. **Therapeutic Ranges for the use of Ozone in Veterinary Medicine and Clinical application Guidelines for small animals**. In: Schwartz, A.M.D.; Sánchez, G.M.; Lawyer, R.Q. Madrid Declaration On Ozone Therapy (3rd Edition). ISCO3 (International Scientific Committee of Ozone Therapy). Avenida Juan Andrés 60, local 1 bajo, 28035, Madrid (Spain), 2020.

Avilés, M. H., Rojo, A. M. M. & González, R. A. Ozone Therapy as a coadjuvant treatment in veterinary oncology. Case reports. **Ozone Therapy Global Journal**, v. 6, n. 1, p. 231-236, 2016.

Baiocchi, E. et al. Estrógeno em tumor de Ehrlich: estudo da sobrevida e avaliação da resposta imunológica. **Arquivos Médicos do ABC**. v. 9, n. 1-2, p. 22-27. 1986.

Barrett-Lee, P. J.; Bailey, N.P.; O'Brien, M.E.R.; Wager, E.. Large-scale UK audit of blood transfusion requirements and anaemia in patients receiving cytotoxic chemotherapy. **British journal of cancer**, v. 82, n. 1, p. 93-97, 1999.

Bocci, V. **Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation**. Springer Science & Business Media, 2002.

Bocci, V. **Ozone A new medical drug**. Springer, 2 ed. 2011b.

Bocci, V. **Ozone a new medical drug**. Springer, Netherland, p. 12-18, 2005.

Bocci, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of inflammation**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2004.

Bocci, V. The rectal insufflation is not the best administration route of ozone. **Revista Española de Ozonoterapia**, v. 3, n. 1, p. 99-100, 2013.

Bocci, V.; Borrelli, E.; Travagli, V.; Zanardi, I. "The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug," **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 4, p. 646–682, 2009.

Bocci, V.; Borrelli, E.; Valacchi, G.; Luzzi, E. Quasi-total-body exposure to an oxygen-ozone mixture in a sauna cabin. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 80, n. 6, p. 549-554, 1999.

Bocci, V.; Luzzi, E.; Corradeschi, F.; Paulesu, L.; Rossi, R.; Cardaioli, E.; Di Simplicio, P. Studies on the biological effects of ozone: 4. Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 7, n. 4, p. 133-138, 1993.

Bocci, V.; Paulesu, L. Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. **Haematologica**, v. 75, n. 6, p. 510-515, 1990.

Bocci, V.; Zanardi, I.; Travagli, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2011a.

Bocci, V.; Zanardi, I. Travagli V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medical gas research**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011c;

Bocci, V.; Valacchi, G.; Corradeschi, F.; Aldinucci, C.; Silvestri, S.; Paccagnini, E.; Gerli, R. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 12, n. 3, p. 67-75, 1998.

Bocci, V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of medical research**, v. 37, n. 4, p. 425-435, 2006.

Borrego, A.; Zamora, Z.B.; González, R. Romay, C.; Menéndez, S.; Hernández, F.; Montero, T.; Rojas, E. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Mediators of inflammation**, v. 13, n. 1, p. 13-19, 2004.

Bray, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

Cardoso, R.F. Avaliação do perfil antimicrobiano do gás ozônio. **International Ozone Association**, São Paulo, 2009.

Cassali, G.D.; Jark, P.C.; Gamba, C.; Damasceno, K.A.; EstrelaLima, A.; De Nardi, A.B.; Ferreira, E.; Horta, R.S.; Firmo, B.F.; Sueiro, F.A.R.; Rodrigues, L.C.S.; Nakagaki, K.Y.R. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors-2019. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555-574, 2020

Cavalcanti MF, Cassali GD. Prognostic factors in the clinical and histopathological diagnosis of breast tumors in bitches – review. **Revista Clínica Veterinária**, v. 11, p. 56-64, 2006.

Cepero, S., Moraleda, M., Noci, J., Soler, J., & Re, L. (2015). World Federation of Ozone Therapy's Review on Evidence Based Ozone Therapy. **WFOT Scientific Advisory Committee 2015**, v. 1, p. 1-117, 2015.

Cheville NF. **Neoplasia: characterizing the neoplasm**. In: Cheville NF. Introduction to veterinary pathology. 3rd ed. Iowa: Blackwell Publishing; p. 169-189, 2006

Cirillo, J. V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas
Chemotherapeutic treatment of mammary neoplasms in female dogs and cats. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 3, p. 325-7, 2008.

Clavo, B.; Santana-Rodríguez, N.; Llontop, P. Gutiérrez, D.; Suárez, G.; López, L.; Rovira, G.; Martínez-Sánchez, G.; González, E.; Jorge, I.J.; Perera, C.; Blanco, J.; Rodríguez-

Esparragón, F. Ozone therapy as adjuvant for cancer treatment: Is further research warranted?. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

Clavo, B.; Santana-Rodriguez, N.; Llontop, P.; Gutierrez, D.; Ceballos, D.; Méndez, C.; Rovira, G.; Suarez, G.; Rey-Baltar, D.; Garcia-Cabrera, L.;Martínez-Sánchez, G.; Fiuza, D. Ozone therapy in the management of persistent radiation-induced rectal bleeding in prostate cancer patients. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

Corbett, J.V. **Laboratory tests and diagnostic procedures with nursing diagnoses**. 7 Ed. 2008. p. 90–107.

De Nardi, A.B.; Rodaski, S.; Sousa, R.S.; Costa, T.A.; Macedo, T.R.; Rodigheri, S.M.; Rios, A.; Piekarz, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**. v.7, p.15-26, 2002.

Delgado-Roche, L.; Riera-Romo, M.; Mesta, F.; Hernández-Matos, Y.; Barrios, J.M.; Martínez-Sánchez, G.; Al-Dalaienf, S.M.. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. **European journal of pharmacology**, v. 811, p. 148-154, 2017.

Delprat C, Lanore D. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Roca; 2004. p.53-170.

Descritores em Ciências da Saúde: DeCS. ed. 2015 rev. e ampl. São Paulo: BIREME / OPAS/OMS, 2021. Disponível em: <https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=54807&filter=ths_termall&q=hormese>. Acesso em: 01/02/21

Dias, M.; Nascimento, T.S.S.; Souza, I.A.; Lima, E.R. Avaliação histopatológica dos órgãos de camundongos com carcinoma de ehrlich tratados com cisplatina, acupuntura e *Euphorbia tirucalli* l. **Cadernos de Naturologia e Terapias Complementares**, v. 7, n. 13, p. 39-46, 2018.

Dias, M.B.M.C; Nascimento, T.S.S.; Ramos, E.H.S.; Teixeira, M.N.; Souza, I.A.; Marinhod, M.L.; Lima, E.R. Perfil Hematológico e Bioquímico de Camundongos com Carcinoma de Ehrlich tratados com Cisplatina, Acupuntura e *Euphorbia tirucalli* L.(avelóz). **Revista Brasileira de Terapias e Saúde**, v. 8, n. 1, p. 7-14, 2017.

Dobson, J. M. Significant advances in veterinary oncology—60 years on. **Journal of Small Animal Practice**, v. 60, n. 12, p. 711-722, 2019.

Doliger S. **Chimiothérapie anticancéreuse**. In: Doliger S. Vade-mecum de cancérologie vétérinaire. Paris: Med'Com; 2003. p.25-89.

Dreher, D.; Junod, A.F. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. **Journal of cellular physiology**, v. 162, n. 1, p. 147-153, 1995.

Ettinger, Stephen J.,Feldman,Edward C.,Côté,Etienne. **Textbook Of Veterinary Internal Medicine: Diseases Of The Dog And The Cat**, Eighth Edition. Elsevier,Inc. 2017

Failace, R.F. **Hemograma: manual de interpretação**. Artmed Editora, 2015.

Ferreira, L.M.; Hochman, B.; Barbosa, M.V.J. **Modelos experimentais em pesquisa**. Acta Cir. Bras. v.20, suppl.2. São Paulo, 2005.

Gowda S.; Desai, P.B.; Kulkarni, S.S.; Hull, V.V.; Math, A.A.K.; Vernekar, S.N. Markers of renal function tests. **North American journal of medical sciences**, v. 2, n. 4, p. 170, 2010.

Güzel, Ö., Yildar, E. & Erdikmen, D. O. Medical ozone and its use in veterinary surgery. **Veteriner Fakültesi Dergisi (Istanbul)**, v. 37, n. 2, p. 177-184, 2011.

Hernández A.M. Ozonoterapia en veterinaria. En Schwartz, **Manual de Ozonoterapia Clínica**. 2 Ed. Medizeus Soluciones, p. 619-644, 2017

Hernández, F., S. Menández, and R. Wong, Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 1, p. 115-119, 1995

Honn, K.V.; Skoff, A. Prostacyclin: a potent antimetastatic agent. **Science**, v. 212, n. 4500, p. 1270-1272, 1981.

INCA, Instituto Nacional de Câncer, **Câncer de mama**. 2020a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 03 de março de 2021.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **O que é câncer?** 2020b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 03 de março de 2021.

INCA. Instituto Nacional do Cancer. **Quimioterapia**. Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tratamento/quimioterapia> Acesso em: 16, mar., 2021.

Joaquim, J.G.F. **Ozonioterapia em Reabilitação Animal**. In:Hummel, J.; Vicente, G. Tratado de Fisioterapia e Fisiatria de Pequenos Animais. Editora Payá. São Paulo. 2019. p. 129-135.

Kim NH, Lim HY, Im KS, Shin JI, Kim HW, Sur JH. Evaluation of clinicopathological characteristics and oestrogen receptor gene expression in oestrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. **Journal of comparative pathology**, v. 151, n. 1, p. 42-50, 2014.

Kızıltan, H.S.; Bayir, A.G.; Yucesan, G.; Eris, A.H.; İdin, K.; Karatoprak, C.; Aydin, T.; Akcakaya, A.; Mayadagli, A. Medical ozone and radiotherapy in a peritoneal, Erlich-ascites, tumor-cell model. **Alternative Therapies Health and Medicine**, v. 21, n. 2, p. 24-29, 2015.

Kosachenco, B.; Calliari, C.; Appel, B.; Mentz, F.; Malschitzky, E. Efecto terapéutico de la Ozonoterapia en la cicatrización de heridas en perros: Reporte de casos. **Rev. Española Ozonoterapia**. v. 8, p. 197–210, 2018.

Kristiansen, V.M.; Nødtvedt, A.; Breen, A.M.; Langeland, M.; Teige, J.; Goldschmidt, M.; Jonasdottir, T.J.; Grotmol, T.; Sørenmo, K.. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 935-942, 2013.

Kuroda, K.; Yamashita, M.; Murahata, Y.; Azuma, K.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Ito, N.; Imagawa T.; Okamoto Y. Use of ozonated water as a new therapeutic approach to solve current concerns around antitumor treatment. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, n. 3, p. 1597-1602, 2018.

Lage-Marques, M. **Estudo da ozonioterapia como contribuição para a odontologia veterinária**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Larini, A.; Bocci, V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology in vitro**, v. 19, n. 1, p. 55-61, 2005

León, O.; Menéndez, S.; Merino, N.; Castillo, R.; Sam, S.; Pérez, L.; Cruz, E.; Bocci V
Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. **Mediators of inflammation**, v. 7, n. 4, p. 289-294, 1998.

Lima, A.O.; Soares, J.B.; Greco, J. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 126-129.

Magro, M. C. S.; Vattimo, M. F. F. Avaliação da função renal: creatinina e outros biomarcadores. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 2, p. 182-185, 2007.

Marchegiani, A. et al. Preoperative topical liposomal ozone dispersion to reduce bacterial colonization in conjunctival sac and periocular skin. **Experimental eye research**, v. 189, p. 107848, 2019.

Matida, E. T. et al. Determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos (*Mus musculus*) do biotério central da UFMS. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**. v. 3, p. 30-35, 2015.

Megele, R.; Riemenschneider, M.J.; Dodoo-Schittko, F.; Feyrer, M.; Kleindienst, A. Intra-tumoral treatment with oxygen-ozone in glioblastoma: A systematic literature search and results of a case series. **Oncology letters**, v. 16, n. 5, p. 5813-5822, 2018.

Menéndez, S.; Cepero, J.; Borrego, L. 'Ozone Therapy in Cancer Treatment: State of the Art', **Ozone: Science & Engineering**, v. 30, n.6, p.398-404. 2008.

Millanta, F.; Calandrella, M.; Citi, S.; Della Santa, D.; Poli, A. Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. **Veterinary pathology**, v. 42, n. 1, p. 30-34, 2005.

Miller, W.G.; Myers, G.L.; Ashwood, E.R.; Killeen, A.A.; Wang, E.; Thienpont, L.M.; Siekmann, L. Creatinine measurement: state of the art in accuracy and interlaboratory harmonization. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 129, n. 3, p. 297-304, 2005.

Mills, S.W.; Musil, K.M.; Davies, J.L.; Hendrick, S.; Duncan, C.; Jackson, M.L.; Kidney, B.; Philibert, H.; Wobeser, B.K.; Simko, E. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. **Veterinary pathology**, v. 52, n. 2, p. 238-249, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Câncer: sintomas, causas, tipos e tratamentos**. 2018. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer#cancer>. Acesso em: 09 de dezembro de 2019.

Ministério da Saúde. **Práticas Integrativas e Complementares (PICS): quais são e para que servem**. 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/praticas-integrativas-e-complementares>. Acesso em: 09 de março de 2020.

Miyazawa, M.; Bogdan, A.R.; Y. Tsuj. Perturbation of iron metabolism by cisplatin through inhibition of iron regulatory protein 2. **Cell chemical biology**, v. 26, n. 1, p.85-97, 2019.

Onuchic, A.C.; Chammas, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

Owen LN. TNM classification of tumors in domestic animals. **Clinical Veterinary Oncology**, 1980.

Ozaslan M.; Karagoz I. D.; Kilic I. H.; Guldur M. E. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

Palermo-Neto J, Massoco CO, Souza WR. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

Pecorelli A, Bocci V. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 267, n. 1, p. 30-40, 2013.

Re, L.; Martínez-Sánchez, G.; Bordicchia, M.; Malcangi, G.; Pocognoli, A.; Morales-Segura, M.A.; Rothchild, J.; Rojas, A.. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. **European journal of pharmacology**, v. 742, p. 158-162, 2014.

Remigio A. C.; Pérez N.; Fernández Y.; Rivero M. E.; Arteaga Z; Zamora Y. G.J. Efecto mutagenico del ozono administrado por insuflación rectal en roedores. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, v. 32, n. 1, 2001.

Renate VH, Sonia LFO, Fahmy Z. Ozone in medicine: clinical evaluation and evidence classification of the systemic ozone applications, major autohemotherapy and rectal insufflation, according to the requirements for evidence-based medicine. **Ozone: Science & Engineering**, v. 38, n. 5, p. 322-345, 2016.

Reth, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. **Nature immunology**, v. 3, n. 12, p. 1129-1134, 2002.

Rhee, S.G.; Bae, Y.S.; Lee, S.R.; Kwon, J., Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. **Science Signaling**, v. 2000, n. 53, p. 1-6, 2000.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Schoen FJ. Neoplasias. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Schoen FJ. **Patología estructural e funcional**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.214-26.

Rodríguez, Z.B.Z.; Gonzalez, E.F.; Lozano, O.L.; Urruchi, W.I. **Ozonioterapia em Medicina Veterinária**. São Paulo: Multimidia Editora, 2017.

Rosenthal, R.C. **Segredos em oncologia veterinária**. Porto Alegre: Artmed; 2004. p.99-199.

Rowland, F. Sherwood. **Stratospheric ozone depletion**. In: Twenty Years of Ozone Decline. Springer, Dordrecht, 2009. p. 23-66.

Sagai, M.; Bocci, V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress?. **Medical gas research**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2011.

Sanches, D.S.; Torres, L.N.; Guerra J.M. **Diagnóstico Histopatológico e Citológico das Neoplasias de Cães e Gatos**. In: ETTINGER, S. J. Tratado de Medicina Interna de Pequenos Animais. 2004.

Sánchez, G.M.; Cepero, S.M.; Noblet, M.C.; Llera, S.D.; Re, L.. Rectal insufflations are a valid way in ozonotherapy. **Revista Española de Ozonoterapia**, v. 2, n. 1, p. 233-235, 2012.

Santos O. J.; Sauaia Filho E. N.; Nascimento F. R.; Júnior F. C.; Fialho E. M.; Santos R. H.; Santos R. A.; Serra I. C. Use of raw *Euphorbia tirucalli* extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 43, n. 1, p. 18-21, 2016.

Schwartz, A.M.D.; Sánchez, G.M.; Lawyer, R.Q. **Madrid Declaration On Ozone Therapy** (3rd Edition). ISCO3 (International Scientific Committee of Ozone Therapy). Avenida Juan Andrés 60, local 1 bajo, 28035, Madrid (Spain), 2020.

Seamer JH, Wood M. Handbooks 5: **Safety in the animal house**. London: Laboratory Animals Ltda; 1981.

Segura, J.A.; Barbero, L.G.; Márquez, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, n. 2, p. 111-115, 2000.

Shimamune T.; Isawamoto, I. Electrolytic ozonizer and its application. **Proc. 11th OzoneWorldCongress**. San Francisco, USA. 1993.

Silva, A.H.C.; Silva, D.M.; Ribas, C.R.; Dittrich, R.L.; Dornbusch, P.T.; Guérios, S.D. Alterações no hemograma de cadelas com neoplasia mamária. **Ciência animal brasileira**, v. 15, n. 1, p. 87-92, 2014.

Silva, N.A.T.; Marcolino, K.G.A.; Alves, F. Análise comparativa das principais alterações hematológicas e renais em pacientes adultos com câncer metastático submetidos à poliquimioterapia. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 10, n. 20, 2020.

Simek, M.; Clupek, M. Efficiency of ozone production by pulsed positive corona discharge in synthetic air. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 35, n. 11, p. 1171, 2002.

Simonetti, V. et al. Association of ozone with 5-fluorouracil and cisplatin in regulation of human colon cancer cell viability: in vitro anti-inflammatory properties of ozone in colon cancer cells exposed to lipopolysaccharides. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-6, 2017.

Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

- Sprenger, L.K.; Risolia, L.W.; Molento, L.G.M.B.; Silva, A.W.C.; Sousa, R.S. tumores neoplásicos de cães e gatos diagnosticados no Laboratório de patologia veterinária da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**. v.20, n.1, p.10-16, 2015.
- Stock C. C., Phylips F. S., Moore A. E., Buckley S. M., Clarke D. A., Barclay R. K., Sugiura K. Sarcoma 180 inhibition screening data. **Cancer research**, v. 15, n. 2, p. 179-331, 1955.
- Stopka, K. twenty years of research and development in ozone technology and equipment with case histories. Proc. 2nd **International Conference**. 1987. Edmonton, Canada.
- Suffredini, I. As bases fisiológicas do câncer e a pesquisa de novos antineoplásicos: A importancia da biodiversidade brasileira. **Journal of the Health Sciences Institute**, p. 103-115, 2002.
- Toyokuni, S.; Okamoto, K.; Yodoi, J.; Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS letters**, v. 358, n. 1, p. 1-3, 1995.
- Vaiano, F.; Loprete, F. Large auto-hemoinfusion versus rectal insufflation in patients with metabolic syndrome. **Ozone Therapy**, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2016.
- Valacchi, G.; Bocci, V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. **Mediators of inflammation**, v. 9, n. 6, p. 271-276, 2000.
- Valadares MC, Queiroz MLS. The effect of a titanocene dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)₂ NCS₂, on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **European journal of pharmacology**, v. 439, n. 1-3, p. 35-42, 2002.
- Vecchione, R.; Quagliariello, V.; Calabria D.; Calcagno, V.; De Luca, E.; Iaffaioli, R.V. Netti, P.A. Curcumin bioavailability from oil in water nano-emulsions: in vitro and in vivo study on the dimensional, compositional and interactional dependence. **Journal of Controlled Release**, v. 233, p. 88–100, 2016.
- Viebahn-Hänsler, R.; León F.; Olga S.; Fahmy, Z. Ozone in medicine: the low-dose ozone concept—guidelines and treatment strategies. **Ozone: Science & Engineering**, v. 34, n. 6, p. 408-424, 2012.

Waked IS, Nagib SH, Omar MT. A single blinded randomized controlled clinical trial on the efficacy of ozone therapy on breast cancer-related lymphedema **Cancer and Clinical Oncology**, v. 2, p. 93-106, 2013.

Withrow SJ, MacEwen EG. **Tumors of the mammary gland**. In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors. *Small animal clinical oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p.356-72.

Yucel, C.; Quagliariello, V.; Iaffaioli, R.V.; Ferrari, G.; Donsì, F. “Submicron complex lipid carriers for curcumin delivery to intestinal epithelial cells: effect of different emulsifiers on bioaccessibility and cell uptake,” **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494; n. 1; p. 357–369, 2015.

Zuo, Y.; Wang, C.; Zhou, J.; Sachdeva, A.; Ruelos, V.C. Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by high-performance liquid chromatography. **Analytical Sciences**, v. 24, n. 12, p. 1589-1592, 2008