

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITOS DA ÁGUA E DO ÓLEO OZONIZADOS NO REPARO TECIDUAL DE
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM RATOS**

Rafael Cavalcante Sanguanini

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

GOIÂNIA

2019

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

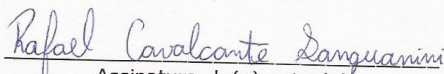
Nome completo do autor: Rafael Cavalcante Sanguanini

Título do trabalho: EFEITOS DA ÁGUA E DO ÓLEO OZONIZADOS NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM RATOS

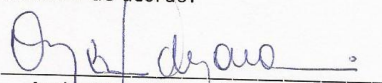
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

Data: 01/10/2019

RAFAEL CAVALCANTE SANGUANINI

**EFEITOS DA ÁGUA E DO ÓLEO OZONIZADOS NO REPARO TECIDUAL DE
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM RATOS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica - CiPAC

Linha de Pesquisa:

Patobiologia e morfofisiologia animal, experimental e comparada

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura - EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof.^a Dr.^a Moema Pacheco Chediak Matos – EVZ/UFG

Prof. Dr. Leandro Guimarães Franco – EVZ/UFG

GOIÂNIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Sanguanini, Rafael Cavalcante

Efeitos da água e do óleo ozonizados no reparo tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos [manuscrito] / Rafael Cavalcante Sanguanini. - 2019.

xiv, 49 f.

Orientador: Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura; co-orientadora Dra. Moema Pacheco Chediak Matos; co orientador Dr. Leandro Guimarães Franco.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. água ozonizada. 2. cicatrização. 3. óleo ozonizado. 4. ozonioterapia. 5. terapia alternativa. I. Moura, Veridiana Maria Brianezi Dignani de, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **526** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **14h00min** do dia **09/07/2019**, reuniu-se na Sala
4 de Defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e
5 Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, nesta Capital, Goiânia, Goiás, a
6 Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de
7 Mestrado apresentada pelo(a) Pós-Graduando(a) **Rafael Cavalcante Sanguanini**, intitulada:
8 "**Efeitos da água e do óleo ozonizados no reparo tecidual de feridas cutâneas**
9 **experimentalmente induzidas em ratos**", apresentada para a obtenção do Título de Mestre em
10 Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica**,
11 desta Universidade. O(A) Presidente da Comissão Julgadora, **Prof.ª Dr.ª Veridiana Maria**
12 **Brianezi Dignani de Moura**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao(a) candidato(a) **Rafael**
13 **Cavalcante Sanguanini**, para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o (a)
14 senhor (a) Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessiva aos Examinadores, os quais
15 passaram a arguir o (a) candidato (a) durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao
16 mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se
17 desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento,
18 considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a)**:

19 Prof.ª Dr.ª Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

20 Prof. Dr. Nazilton de Paula Reis Filho

21 Prof.ª Dr.ª Liliana Borges de Menezes

22 Em face ao resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Rafael Cavalcante**
23 **Sanguanini**, *habilitado* [(**Habilitado(a)** ou não **Habilitado(a)**] pelo(s)

24 motivo(s) abaixo exposto(s):

25 _____

26 _____

27 _____

28 _____

29 _____

30 _____

31 _____

32 _____

33 _____

34

35

36 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

37

38

39

40

41

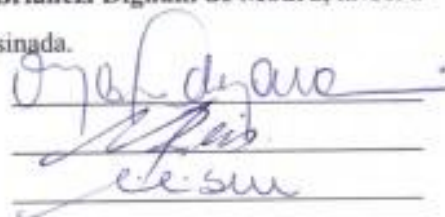
42

43 Nada mais havendo a tratar, eu, **Prof.ª Dr.ª Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura**, lavrei a
44 presente ata que, após lida e achada conforme, foi por todos assinada.

45 Prof.ª Dr.ª Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

46 Prof. Dr. Nazilton de Paula Reis Filho

47 Prof.ª Dr.ª Liliana Borges de Menezes



Dedico este trabalho aos meus pais,
Edilamar e Evandro, e à minha irmã, Amanda

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me permitido completar mais essa etapa na minha trajetória aqui na Terra.

À minha família, sobretudo aos meus pais, Edilamar e Evandro, e minha irmã, Amanda. Sem vocês, com certeza eu não teria chegado tão longe. Obrigado por darem sentido à minha vida e por serem o alicerce mais firme que já se viu.

Ao meu namorado, Zélio, e minhas cunhada e sogra, Zenialice e Antônia. Vocês são maravilhosos, e não tenho palavras para descrever minha gratidão e meu amor por vocês.

Aos grupos Arte Nascente - GAN e Zapt Arteatral, por terem preenchido meu último ano com muita alegria, ensinamentos e oportunidades de ser melhor. Gratidão por terem sido, quase sempre, a válvula de escape que me impediu de desanimar.

Aos meus amigos, principalmente àqueles que estiveram presentes nessa jornada, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado. Em especial Evelyn de Oliveira, Bruna Dantas Matos, Nadine Bou Fares, Estela Vieira, Eric Saymom Andrade Brito, Mariana Fagundes Bento, Mariana B R Faleiro, Leiny Paula, Pamella Fernanda, Ana Carolina Pedroso, Lorena Cardoso Cintra e todos aqueles que de alguma forma, em maior ou menor grau, me ajudaram e me incentivaram.

Ao Setor de Patologia Animal da EVZ/UFG e ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, por fornecerem o ambiente, os equipamentos e os recursos para a realização desta pesquisa, sobretudo na figura dos professores e técnicos que não pouparam esforços na acolhida e no compartilhamento de seus conhecimentos: Dr.^a Ana Paula Iglesias Santin, Dr.^a Regiani Gagno Pôrto, Dr. Luiz Augusto Batista Brito, Antônio Souza da Silva, Bruna Siqueira Gomes de Lima, Dr.^a Marina Pacheco Miguel, Dr.^a Liliana Borges de Menezes, Gisleine Fernanda França e Daniel Silva Goulart. Agradeço também o Dr. Emmanuel Arnhold, pela prontidão em atender minhas dúvidas.

Àqueles que me orientaram durante esse período, em especial ao Dr. Leandro Franco Guimarães, Dr.^a Moema Pacheco Chediak Matos e, sobretudo, a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, pessoa que considero como mestre, amiga e, por vezes, até como mãe. Gratidão por tudo, professora.

E a todos aqueles que fizeram parte da minha história, meu muito obrigado. Se não fosse por vocês, eu não estaria escrevendo essas palavras hoje.

"If you can't love yourself, how in the hell you're gonna love somebody else? Can I get an amem up in here?"

(RuPaul)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Reparo tecidual.....	3
2.2. Cicatrização	4
2.2.1. Fase inflamatória	5
2.2.2. Fase proliferativa	7
2.2.3 Fase de maturação e remodelamento	9
2.3. Ozonioterapia.....	10
2.3.1. Contextualização histórica da ozonioterapia	10
2.3.2. Ozônio: propriedades físico-químicas, finalidade e toxicidade	11
2.3.3. Mecanismo de ação do ozônio.....	12
2.3.4. Vias de aplicação da ozonioterapia	14
2.3.5. Água e óleo ozonizados.....	16
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2 - EFEITOS DE SOLUÇÕES OZONIZADAS SOBRE O REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM RATOS.....	22
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	48

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1- Esquema do reparo tecidual na pele. À esquerda, lesão superficial com pequena reação inflamatória, reparada por regeneração. À direita, lesão acentuada e profunda, com resposta inflamatória acentuada, que sofreu reparo por cicatrização..... 3
- FIGURA 2- Angiogênese. Brotamento do vaso por migração e proliferação de células endoteliais, seguido de maturação do vaso a partir do recrutamento de pericitos..... 8
- FIGURA 3- Reações envolvendo os poluentes NO e NO₂ na atmosfera e a consequente formação de ozônio (O₃) na troposfera..... 11

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1- Distribuição dos ratos em grupos e subgrupos de acordo com o tratamento e o momento da eutanásia e colheita das amostras para avaliação microscópica aos três, oito, 15 e 22 dias após a indução das feridas. GA = água ozonizada (azul); GCL = cloreto de sódio a 0,9% (amarelo); GO = óleo ozonizado (verde); e GAL = creme de alantoína a 0,2% (vermelho) 26
- FIGURA 2 - Ferida induzida na pele de um rato. Bordas da ferida demarcadas com a ferramenta *free hand selection* (linha amarela), e o comando *measure* utilizado para o cálculo da área em mm²..... 28
- FIGURA 3 - Análise colorimétrica para mensuração de ozônio em água. No frasco à esquerda, amostra testada imediatamente após a ozonização da água. No frasco à direita, amostra testada 10 minutos após a ozonização. A intensidade da cor é proporcional à concentração de ozônio..... 31
- FIGURA 4 - Ferida no dorso dos ratos dos grupos água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL) aos dias zero (à esquerda) e oito (à direita) após a indução da lesão. Feridas de tamanho semelhante ao dia zero em todos os grupos e, aos oito dias após a indução da lesão, a ferida do rato do GA exibe maior retração em relação àquela dos ratos dos demais grupos 32
- FIGURA 5 - Representação gráfica das médias do grau de retração (em porcentagem) das feridas dos grupos GA (água ozonizada), GCL (cloreto de sódio), GO (óleo ozonizado) e GAL (alantoína) em função do tempo..... 33
- FIGURA 6 - Representação gráfica do número de vasos sanguíneos nos grupos GA (água ozonizada), GCL (cloreto de sódio), GO (óleo ozonizado) e GAL (alantoína) em função do tempo..... 35

FIGURA 7 -	Fotomicrografias da pele dos ratos dos grupos GA (A), GCL (B), GO(C) e GAL (D), respectivamente, ao 15º dia após a indução da ferida cutânea, mostrando os vasos neoformados (setas). A) Neovascularização moderada. B) e D) Neovascularização discreta. C) Neovascularização acentuada. HE	36
FIGURA 8 -	Fotomicrografias da pele dos ratos mostrando fibras colágenas dos tipos I e III nos dias oito, 15 e 22 após a indução nos grupos tratados com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL). <i>Picosirius red</i> , objetiva 40x	37
FIGURA 9 -	Representação gráfica das porcentagens de colágeno tipos I e III nos grupos GA (água ozonizada), GCL (cloreto de sódio), GO (óleo ozonizado) e GAL (alantoína) em função do tempo.....	39
FIGURA 10 -	Fotomicrografias da pele dos ratos dos grupos GA (A), GCL (B), GO (C) e GAL (D), respectivamente, ao 8º dia após indução da ferida cutânea. Imunomarcção acentuada do VEGF no grupo GO (C). IHQ, anti-VEGF.....	40
FIGURA 11 -	Representação gráfica das medianas da imunomarcção de VEGF na ferida cutânea dos ratos dos grupos GA (água ozonizada), GCL (cloreto de sódio), GO (óleo ozonizado) e GAL (alantoína) em função do tempo.....	41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 -	Médias e medianas referentes ao percentual de retração da ferida cutânea em ratos submetidos a diferentes tratamentos aos momentos três, oito, 15 e 22 dias após o procedimento cirúrgico. GA = grupo água ozonizada; GCL = grupo cloreto de sódio; GO = grupo óleo ozonizado; GAL = grupo alantoína.....	33
TABELA 2 -	Medianas das variáveis infiltrado polimorfonuclear, infiltrado mononuclear, edema, tipo de MEC, reepitelização e acantose na ferida cutânea dos ratos dos diferentes tratamentos e em função do tempo (três, oito, 15 e 22 dias após a indução da ferida). GA = grupo água ozonizada; GCL = grupo cloreto de sódio; GO = grupo óleo ozonizado; GAL = grupo alantoína	34
TABELA 3 -	Medianas da neovascularização na ferida cutânea dos ratos aos dias três, oito, 15 e 22 após a indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).....	35
TABELA 4 -	Médias da quantidade total de fibras colágenas na ferida cutânea dos ratos aos dias oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).....	37
TABELA 5 -	Médias da quantidade de fibras colágenas do tipo I na ferida cutânea dos ratos aos dias oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).....	38
TABELA 6 -	Médias da quantidade de fibras colágenas do tipo III na ferida cutânea dos ratos aos dias oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).....	38
TABELA 7 -	Médias das porcentagens de fibras colágenas dos tipos I e III em relação ao colágeno total nas feridas cutâneas dos ratos aos dias oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).....	39
TABELA 8 -	Medianas da imunomarcção de VEGF na ferida cutânea dos ratos aos dias três, oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL)....	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,3-DPG	- 2,3-difosfoglicerato
Ang 1	- Angiopietina 1
Ang 2	- Angiopietina 2
ATP	- Adenosina trifosfato
CH ₄	- Metano
CO	- Monóxido de carbono
DAMP	- Padrões moleculares associados à danos
EGF	- Fator de crescimento epidermal
EGFR	- Receptor de fator de crescimento epidermal
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
FGF	- Fator de crescimento fibroblástico
FGFR	- Receptor de fator de crescimento fibroblástico
FNKB	- Fator nuclear Kappa Beta
g	- Gramas
GRP	- Proteínas reguladas por glicose
GSH	- Glutathiona reduzida
GSH-Px	- Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HClO	- Ácido hipocloroso
HSP	- Proteínas de choque térmico
IgG	- Imunoglobulina G

IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina6
IL-12	- Interleucina 12
IL-13	- Interleucina 13
IL-10	- Interleucina 10
Km	- Quilômetro
mcg	- Microgramas
MEC	- Matriz extracelular
mg	- Miligrama
mL	- Mililitros
mmol	- Micromolar
MMP	- Metaloproteinases
NO	- Óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio
NO ₂	- Dióxido de nitrogênio
Nrf2	- Fator nuclear eritróide 2
O	- Átomo de oxigênio
O=NOO ⁻	- Peroxinitrito
O ₂	- Forma alotrópica diatômica do oxigênio / Molécula de oxigênio
O ₂ ⁻	- Ânion superóxido
O ₃	- Forma alotrópica triatômica do oxigênio / Ozônio
°C	- Grau Celsius
OH ⁻	- Radical hidroxila

OMS	- Organização Mundial de Saúde
OSP	- Proteínas de choque oxidativo
PAMP	- Padrões moleculares associados à patógenos
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	- Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	- Potencial hidrogeniônico
PLOs	- Produtos lipídico-oxidantes
ppm	- Parte por milhão
ppmv	- Parte por milhão por volume
ROO ⁻	- Radical peroxil
R-OOH	- Hidroperóxidos
SDF-1	- Fator derivado de estroma
TGF- α	- Fator de crescimento transformador alfa
TGF- β	- Fator de crescimento transformador beta
TIMP	- Inibidores de metaloproteinases
TLR	- Receptores do tipo <i>toll</i>
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
UV	- Ultravioleta
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	- Receptor de fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

A relevância das feridas cutâneas na rotina da clínica médica veterinária denota a importância da ampliação das técnicas terapêuticas economicamente viáveis voltadas ao seu tratamento. A aplicação de soluções ozonizadas, sobretudo a água e o óleo ozonizados, constam como técnicas que podem auxiliar no processo de reparo tecidual. Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar e comparar os efeitos da água e do óleo ozonizados sobre o reparo tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos. Para isso, foram utilizados 48 ratos albinos, da linhagem Wistar, fêmeas, com peso corporal entre 250 a 300 gramas. Foram confeccionadas feridas de 9 mm de diâmetro no dorso dos animais, entre as escápulas, as quais foram tratadas uma vez ao dia, nos diferentes grupos experimentais, sendo 12 ratos tratados com água ozonizada (GA), 12 com óleo ozonizado (GO), 12 com creme de alantoína a 0,2% (GAL) e 12 com cloreto de sódio a 0,9% (GCL). As feridas foram submetidas a morfometria macroscópica e avaliação microscópica com HE, *picrosirius red* e imunomarcagem para fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). À avaliação macroscópica a ferida dos animais do grupo GA apresentou maior porcentagem de retração em relação àquela dos ratos dos demais grupos aos dias três, oito e 15 após a indução, sendo a retração da ferida dos animais do GA estatisticamente maior do que aquela dos ratos dos grupos GO e GAL nos dias três e oito ($p < 0,05$). Em relação ao tipo de matriz extracelular (MEC) nas feridas, não houve diferença estatística entre os grupos estudados. No entanto, a coloração de *picrosirius red* mostrou que os grupos GA e GO apresentaram maior deposição de colágeno total aos 15 e aos 22 dias de tratamento, respectivamente. Além disso, nesses momentos de avaliação, esses grupos apresentaram maior porcentagem de fibras colágenas do tipo I em relação a outros grupos ($p < 0,05$). Ainda, a variável neovascularização foi maior na ferida dos ratos do GO em todos os dias avaliados, sendo estatisticamente maior aos três e oito dias em relação ao grupo GCL, aos 15 dias em relação ao GCL e ao GAL. Já aos 22 dias, o grupo GA apresentou uma quantidade significativamente menor de vasos em relação aos outros grupos, o que indica que este grupo entrou mais rapidamente em remodelamento da cicatriz. Esses achados foram corroborados pela marcação imunoistoquímica do VEGF, que se apresentou maior no grupo GO em todos os momentos, o que gerou imunomarcagem significativamente maior na ferida dos animais deste grupo aos oito dias em relação ao grupo GCL, aos 15 dias em relação ao grupo GA, e aos 22 dias em relação aos grupos GA e GCL. Conclui-se que a água e o óleo ozonizados nas concentrações testadas contribuem com o processo de reparo tecidual em feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos. A água ozonizada potencializa a retração da ferida, bem como promove melhor organização do epitélio e acelera a entrada da cicatrização na fase de maturação e remodelamento, levando em consideração a maior deposição de colágeno do tipo I aos 15 dias e menor vascularização aos 22 dias; enquanto o óleo ozonizado à concentração de 418,48 mEq/kg de peróxidos promove maior neovascularização durante o reparo tecidual, além de maior deposição de colágeno do tipo I a partir da terceira semana de tratamento.

Palavras-chave: água ozonizada, cicatrização, óleo ozonizado, ozonioterapia, pele, terapia alternativa.

ABSTRACT

The relevance of cutaneous wounds in the veterinary routine indicates the importance of the expansion of economically viable therapeutic techniques aimed at its treatment. The application of ozonized solutions, especially ozonated water and oil, are presented as techniques that may contribute in the tissue repair process. This study aimed to evaluate and compare the effects of ozonated water and oil on the tissue repair of experimentally induced wounds in rats. Forty-eight female Wistar albino rats weighing between 250 and 300 grams were used. Single 9 mm in diameter wounds were performed on the dorsum of the animals, between the scapulae. The wounds were treated daily in the different experimental groups, with 12 mice treated with ozonated water (GA), 12 mice with ozonated oil (GO), 12 mice with 0,2% allantoin cream (GAL) and 12 rats treated with 0,9% sodium chloride (GCL). The wounds were submitted to macroscopic morphometry and microscopic evaluation with HE, picrosirius red and immunostaining for vascular endothelial growth factor (VEGF). At the macroscopic evaluation, the GA group animals presented a higher percentage of retraction than the rats of the other groups at days three, eight and 15 after induction, and the GA retraction was statistically larger than that of the rats of the GO and GAL groups on days three and eight ($p < 0,05$). Regarding the type of extracellular matrix (ECM) in the wounds, there was no statistical difference between the studied group. However, picrosirius red staining showed that the GA and GO groups showed higher total collagen deposition at 15 and 22 days of treatment, respectively. Moreover, at these times of evaluation, these groups presented a higher percentage of type I collagen fibers compared to other groups ($p < 0,05$). Moreover, the neovascularization variable was higher in the GO rats wound on all evaluated days, being statistically higher at three and eight days compared to the GCL group, at 15 days compared to the GCL and GAL. At 22 days, the GA group had a significantly smaller number of vessels compared to the other groups, indicating that this group went into scar remodeling more quickly. These findings were corroborated by VEGF immunohistochemistry marking, which was higher in the GO group at all times, which generated significantly greater immunostaining in the animal's wounds at 8 days compared to the GCL group, at 15 days compared to the group GA, and at 22 days for the GA and GCL groups. It is concluded that ozone water and oil at the tested concentrations contribute to the tissue repair process in experimentally induced skin wounds in rats. Ozonized water enhances wound retraction as well as promotes better epithelial organization and accelerates the onset of healing in the maturation and remodeling phase, taking into account the greater deposition of type I collagen at 15 days and less vascularization at 22 days; while ozonized oil at 418,48 mEq/kg of peroxides promotes greater neovascularization during tissue repair, as well as greater deposition of type I collagen from the third week of treatment.

Keywords: alternative therapy, skin, healing, ozonotherapy, ozonatedoil, ozonated water.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

No organismo animal, as lesões são caracterizadas pela perda da integridade de um tecido, com ou sem comprometimento das estruturas do estroma adjacente. Essas lesões podem ser causadas por agentes físicos, químicos e biológicos¹ e, tendo a ampla possibilidade em termos de etiologia, essas são muito comuns². Ainda, dentre as lesões teciduais, as feridas cutâneas estão entre as mais importantes devido a relativa facilidade com que ocorrem e são notadas, o que faz com que apresentem grande casuística na clínica médica veterinária³.

O processo de resposta orgânica à lesão envolve dois fenômenos biológicos fundamentais à sobrevivência do organismo animal, a inflamação e o reparo tecidual. Este último ocorre por regeneração ou cicatrização e caracteriza-se por uma série de reações que visam a recuperação do tecido lesado. Alterações no equilíbrio dessa resposta podem gerar complicações e, por isso, há diversos tratamentos voltados a auxiliar o reparo tecidual^{2,4,5}.

O tratamento de feridas é pauta de estudos na medicina há anos, o que promoveu grande avanço no conhecimento dos tipos de lesão e do reparo tecidual, além de fatores neste envolvidos. Nesse sentido, foram desenvolvidos inúmeros protocolos terapêuticos voltados ao tratamento de feridas⁶. Contudo, persiste a busca por tratamentos alternativos que sejam menos invasivos e economicamente acessíveis, além de métodos que não induzam resistência bacteriana e substituam fármacos que apresentem efeitos colaterais ou reações adversas.

Nesse contexto, a ozonioterapia desponta como uma opção para o tratamento de diferentes enfermidades e vem sendo utilizada na medicina e medicina veterinária. Dentre suas vantagens destacam-se o baixo custo, a baixa invasividade, a ação antimicrobiana, a fácil aplicação sistêmica ou local e a ausência de efeitos colaterais, intolerância ou contra-indicações quando utilizada em doses terapêuticas⁷⁻¹⁰.

A ozonioterapia é a técnica que utiliza uma mistura gasosa de ozônio e oxigênio para produzir estresse oxidativo transitório e não deletério, desencadeando uma série de mecanismos benéficos. Trata-se de uma terapia historicamente subutilizada, considerando que o ozônio é uma molécula que apresenta natureza potencialmente tóxica^{8,9}. No entanto, estudos foram mostrando o caminho para encontrar nessa substância de ação nociva um agente terapêutico extremamente versátil, que pode auxiliar na cura ou no abrandamento de diferentes enfermidades, e assim a ozonioterapia tem sido cada vez mais aceita¹⁰.

Contudo, apesar do que já se conhece sobre a ozonioterapia, a falta do entendimento completo de seus mecanismos sistêmicos e de protocolos bem estabelecidos ainda são lacunas a preencher. Portanto, a ozonioterapia representa uma área rica para a experimentação que, ao agregar dados e evidências clínicas, contribuirá para consagrar a técnica como forma de tratamento de doenças e lesões, especialmente feridas cutâneas¹¹.

Os trabalhos que empregam a ozonioterapia no tratamento de feridas cutâneas utilizam diferentes métodos e não comparam as técnicas entre si. Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo comparar duas formas de aplicação tópica do ozônio (água e óleo ozonizados) entre si, assim como com tratamentos controle positivo (creme de alantoína 0,2%) e negativo (cloreto de sódio 0,9%), para averiguar sua ação junto ao reparo tecidual em feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos. Com esse delineamento buscou-se avaliar a eficiência terapêutica da ozonioterapia e mesmo eventuais variações de eficiência entre as técnicas empregadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Reparo tecidual

O reparo tecidual é o evento biológico pelo qual o organismo busca eliminar os danos causados nos tecidos, visando restaurar sua integridade anatômica e funcional. Pode ocorrer através da regeneração ou da cicatrização do tecido acometido (Figura 1), a depender de fatores como extensão da lesão, tipo de tecido envolvido e capacidade de regeneração das células, assim como das características do agente causador da lesão^{1,4,12}.

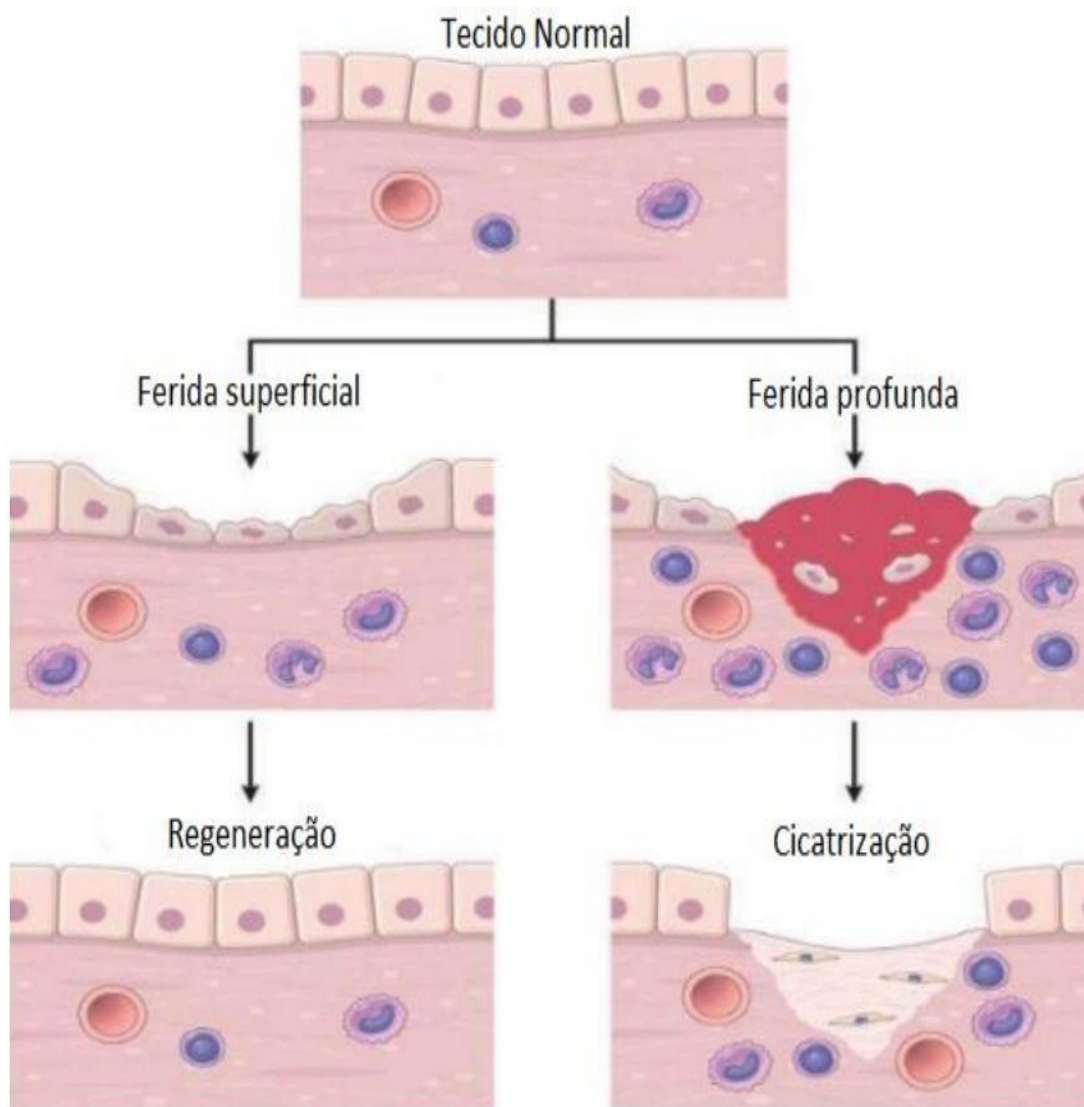


FIGURA 1 - Esquema do reparo tecidual na pele. À esquerda, lesão superficial com pequena reação inflamatória, reparada por regeneração. À direita, lesão acentuada e profunda, com resposta inflamatória acentuada, que sofreu reparo por cicatrização. Adaptado de Abbas¹²

Feridas de pequena gravidade geralmente tendem à regeneração. No entanto, feridas com comprometimento das camadas mais profundas do tecido, representadas por perdas significativas de parênquima e estroma, são reparadas por cicatrização. Por exemplo, estudos em humanos mostram que a profundidade da lesão cutânea é determinante na forma como o organismo realizará o reparo da ferida. Os fibroblastos nas diferentes camadas da derme, dividida em papilar (superficial) e reticular (profunda), apresentam diferentes respostas ao estímulo de injúria. Fibroblastos da camada papilar respondem regenerando o tecido lesado, enquanto feridas que alcançam as camadas mais profundas da derme estimulam a cicatrização a partir dos fibroblastos da camada reticular¹³⁻¹⁵.

À semelhança, diferentes tipos celulares respondem de forma distinta às agressões que sofrem. Hepatócitos e queratinócitos são células com capacidade de proliferar, gerando assim respostas regenerativas. Já as células do tecido nervoso e do músculo estriado cardíaco não são capazes de realizar mitose quando adultas e diferenciadas, sendo tecidos alvo de cicatrização. Por fim, a natureza do agente agressor também influencia a resposta orgânica que levará ao reparo tecidual. Diferentes tipos de agentes infecciosos, dependendo de sua virulência, podem gerar desde lesões de fácil resolução até abscessos e granulomas¹².

O reparo tecidual engloba uma complexa série de eventos imunológicos, bioquímicos e celulares que, caso descoordenados, podem acarretar lesões crônicas ou ainda fibroses extensas e indesejáveis^{16,17}. Para efeitos didáticos, essa cascata de eventos pode ser dividida em etapas, sendo duas comuns à regeneração e cicatrização, as quais denominadas fases inflamatória e proliferativa, com suas especificidades em cada um dos tipos de reparo; e a terceira fase, a de maturação e remodelamento, característica do reparo por cicatrização^{4,5,12}.

2.2. Cicatrização

A cicatrização ocorre quando a lesão a ser reparada é muito grave ou quando o tecido afetado é incapaz de regenerar, a exemplo dos tecidos muscular cardíaco e nervoso. As células nesses locais são terminalmente diferenciadas e não proliferativas na fase pós-natal, o que confere às mesmas a denominação de células perenes ou permanentes. Perante lesões irreversíveis e morte celular, a única alternativa de reparo tecidual nesses casos é a substituição da área afetada por fibrose ou cicatriz^{2,12}.

O reparo por cicatrização ocorre em três fases e tem início com a fase inflamatória como resposta à lesão tecidual. Posteriormente, na fase proliferativa, ocorrem angiogênese e fibroplasia, havendo deposição de matriz colágena, que junto com leucócitos infiltrados e

capilares neoformados conferem à lesão aparência rosada e granular, o que caracteriza o denominado tecido de granulação. Com a progressão da fase proliferativa, em que há crescente deposição de colágeno, o processo de cicatrização evolui a sua fase final, de maturação e remodelamento do tecido fibroso^{16,17}.

2.2.1. Fase inflamatória

A inflamação é a primeira resposta do organismo frente à agressão ou ameaça. Trata-se da contrapartida imunológica e sua função é eliminar a causa inicial da injúria e remover células e tecido mortos, além de iniciar a cascata de eventos que culminam no reparo tecidual^{4,19}. A inflamação tem início quando células residentes no tecido reconhecem a quebra da homeostasia via receptores do tipo *Toll*(TLR) e inflamossomas, a partir da detecção de padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) e padrões moleculares associados à danos (DAMP). Macrófagos, mastócitos e eventuais linfócitos, além das células do próprio tecido afetado iniciam a liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios, as citocinas, que agem de modo a promover alterações vasculares e, em seguida, a mediar eventos celulares. As citocinas liberadas são as interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 12 (IL-12), e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)^{16,18,19,20}.

Em casos de lesão mecânica, há vasoconstrição imediata como resposta reflexa e liberação de substâncias que desencadeiam reação hemostática. Isso resulta em ativação da cascata de coagulação, com agregação plaquetária e formação do tampão de fibrina e trombina. Em seguida, evoluem os eventos vasculares da inflamação^{2,5,21}.

Os vasos sanguíneos iniciam a vasodilatação, mediada pela liberação de óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio (NO) e citocinas pró-inflamatórias como bradicinina, histamina e prostaglandinas, o que permite maior aporte sanguíneo à área da lesão. Além disso, há aumento da permeabilidade vascular, com exsudação de plasma e proteínas ao interstício, causando edema. As células endoteliais sofrem alterações e expressam substâncias aderentes em sua superfície, permitindo a marginação, rolamento e adesão de leucócitos na parede dos vasos sanguíneos e a transmigração ao espaço intersticial por diapedese^{12,19}.

No espaço intersticial, as células de defesa migram em direção ao local da lesão por quimiotaxia, que é mediada por substâncias endógenas ou exógenas como antígenos bacterianos, citocinas, componentes do sistema complemento (C5) e leucotrieno B₄. A característica referente ao tipo de célula que compõe o infiltrado depende especialmente da causa da lesão. Os neutrófilos são as primeiras células a infiltrar, sendo posteriormente

substituídos por macrófagos. De outra parte, inflamações crônicas e infecções virais comumente estimulam infiltrado de linfócitos. Já em reações de hipersensibilidade e parasitoses o infiltrado predominante pode ser de eosinófilos^{16,21}.

Os leucócitos realizam a fagocitose de células mortas e microrganismos, processo que envolve três etapas: 1) reconhecimento e ligação, 2) englobamento e 3) morte e degradação. O reconhecimento é realizado por meio de receptores específicos na superfície dos leucócitos, que reconhecem componentes dos microrganismos, de células mortas ou ainda partículas proteicas do próprio hospedeiro, chamadas opsoninas. Estas são principalmente anticorpos IgG, produtos da degradação da proteína C3 do complemento e coletinas. Essas partículas se ligam à parede celular dos microrganismos, processo conhecido como opsonização, facilitando o reconhecimento, a ligação às células de defesa e, conseqüentemente, a fagocitose. A etapa de englobamento consiste na emissão de pseudópodes pelo leucócito, que engloba o fagócito e forma um vacúolo denominado fagossoma que, ao fundir com o lisossomo, é chamado de fagolisossoma. É neste que a etapa morte e degradação da fagocitose ocorre, pela liberação de proteases, enzimas líticas e antimicrobianas como catepsinas, defensinas, lactoferrina, lisozima, espécies reativas de oxigênio (EROS), espécies reativas de nitrogênio (NO), colagenases e elastases^{12,22,23}.

Ressalte-se que essas substâncias também são liberadas no meio extracelular como forma de realizar a lise no interstício. Isso ocorre quando há microrganismos de alta virulência que driblam a fagocitose, como tentativa normal de remover restos de tecido morto, ou ainda em doenças autoimunes, alergias e processos inflamatórios exacerbados. Nesses casos, essas substâncias também atuam sobre células normais, causando maior dano^{17,23}.

Para que se abra caminho à cura da lesão tecidual e para que se possa modular ou descontinuar o processo inflamatório são necessários mecanismos anti-inflamatórios. Os metabólitos do ácido araquidônico, incluindo prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos, são potentes agentes inflamatórios secretados pelos leucócitos. No entanto, uma vez no tecido, os leucócitos alteram seus principais produtos do ácido araquidônico para lipoxinas, que são metabólitos que apresentam ação anti-inflamatória, inibindo a quimiotaxia e a aderência de leucócitos no endotélio. O sistema complemento também estimula a inflamação e sua ação é controlada pelas proteínas reguladoras do complemento, que são a proteína inibidora de C1, o fator acelerador de decomposição e o fator H. Os macrófagos liberam IL-10, que inibe a resposta de macrófagos ativados, gerando um *feedback* negativo. O fator de crescimento transformador- β (TGF- β) também possui ação anti-inflamatória e estimula a síntese de matriz extracelular (MEC) pelos fibroblastos, iniciando a fase proliferativa do reparo. Em

contrapartida, reações inflamatórias inadequadas ou sua ausência impedem a cura da ferida, o que pode levar à cronicidade^{12,18,19}. Esse conhecimento reafirma a importância da regulação da fase inflamatória, na qual os leucócitos iniciam a secreção de fatores de crescimento, o ponto de partida para o recrutamento de fibroblastos e células epiteliais, fundamental para a preparação da fase proliferativa¹⁸.

2.2.2. Fase proliferativa

Durante o reparo várias células proliferam, dentre as quais as do próprio tecido lesado, respeitando a capacidade de multiplicação intrínseca do tipo celular em questão (células lábeis, estáveis ou permanentes), com o intuito de reparar perdas celulares; as células endoteliais, para levar nutrição à região afetada; e os fibroblastos, que são responsáveis por produzir matriz conjuntiva para reparar por cicatrização o que não pôde regenerar^{15,16}.

A proliferação é estimulada por proteínas denominadas fatores de crescimento, que articulam a migração e a diferenciação de células, promovem epitelização, angiogênese e estimulam a produção e o remodelamento da MEC¹⁸. Esses fatores são produzidos durante a inflamação por macrófagos e linfócitos, ou ainda por células do parênquima e/ou do estroma do tecido lesado¹². Os de maior relevância incluem fator de crescimento epidermal (EGF), TGF- β , fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)¹⁹.

O reparo tecidual está diretamente ligado à MEC, que é formada por diversas proteínas e desenvolve funções como regular a proliferação, o movimento e a diferenciação de células junto ao seu microambiente. A MEC se apresenta como matriz intersticial ou membrana basal. A primeira é constituída principalmente por colágenos fibrilares e não fibrilares, fibronectina, elastina, proteoglicanos e hialuronatos, e ocupa o espaço entre as células do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e músculo liso. Já a membrana basal é composta especialmente por colágeno não fibrilar tipo IV e laminina, e se localiza abaixo dos epitélios e ao redor dos vasos sanguíneos¹².

A fase proliferativa subdivide-se em dois momentos, sendo o primeiro caracterizado pela proliferação de células endoteliais e neovascularização na área afetada, fenômeno biológico conhecido como angiogênese; e o segundo caracteriza-se pelo recrutamento e proliferação de fibroblastos, e estimulação de deposição de MEC, processo conhecido como fibroplasia. Em tecidos como a pele, há ainda a reepitelização, que conta

com a proliferação de queratinócitos e a migração de células epidermais que cobrem a cicatriz^{18,25}.

A angiogênese é coordenada por fatores de crescimento e ocorre por meio do brotamento de capilares a partir de vasos sanguíneos adjacentes em direção à área da lesão (Figura 2). Entre os fatores de crescimento envolvidos na angiogênese destacam-se o VEGF, o FGF-2 e as angiopoietinas (Ang 1 e Ang 2). A hipóxia, o PDGF e os TGF- α e TGF- β induzem a produção e liberação de VEGF, que estimula a vasodilatação, a migração e a proliferação de células endoteliais. O FGF-2 atua na angiogênese estimulando a proliferação de endotélio e as angiopoietinas atuam na maturação dos vasos neoformados, através do recrutamento de pericitos e de células musculares lisas^{2,12,26}.

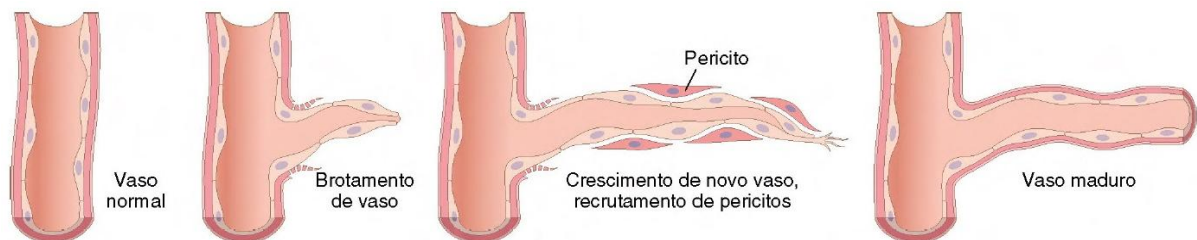


FIGURA 2 - Angiogênese. Brotamento do vaso por migração e proliferação de células endoteliais, seguido de maturação do vaso a partir do recrutamento de pericitos.

Fonte: Abbas¹²

A fibroplasia, assim como a fase de maturação e remodelamento, dependem da interação balanceada entre fatores pró-fibróticos e anti-fibróticos. Esses fatores geram um ambiente de sinalizações que guiam o andamento do reparo tecidual e o produto final depende diretamente do equilíbrio dessa resposta, que quando descompensada pode levar à formação de cicatrizes hipertróficas¹⁶. A deposição de tecido conjuntivo na cicatrização inicia com a migração e a proliferação de fibroblastos e segue com a produção de MEC por estas células. Os fatores de crescimento coordenam essa etapa da fase proliferativa e são produzidos por células inflamatórias, sobretudo os macrófagos, mas com a participação de mastócitos e linfócitos, e outras células como as endoteliais, plaquetas e do tecido lesado^{13,16}.

O FGF, além de atuar na angiogênese, também desempenha papel quimiotático para macrófagos e fibroblastos e formação de MEC. Já o TGF- β desempenha funções diversas a depender do contexto que se encontre. Na fibroplasia apresenta ação moduladora da inflamação por meio da regulação da multiplicação e atividade de leucócitos, além de estimular o influxo de fibroblastos e a síntese de colágeno, proteoglicanos e fibronectina, enquanto reduz a atividade de proteinases degradadoras de colágeno²⁷. O PDGF é liberado

por plaquetas, mas também pode ser produzido por macrófagos ativados, células endoteliais e células musculares lisas, e está envolvido com a migração e a proliferação de fibroblastos, além de sua transformação em miofibroblastos. Também estimula a síntese de MEC e impede a apoptose de miofibroblastos¹⁶.

Algumas citocinas, como IL-1 e IL-13 também podem atuar como fatores de crescimento, estimulando a migração e a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno pelos mesmos¹⁷. À medida que a cicatrização progride, os fibroblastos cessam sua proliferação e assumem ação predominante de sintetizar de matriz colágena, enquanto a vascularização na cicatriz inicia sua regressão. A cicatriz, ao contrário do tecido de granulação, é avascular e pálida¹².

A reepitelização é uma etapa da fase proliferativa que ocorre na pele. Nesta, o tecido de granulação é coberto por células epidermais, conferindo o fechamento da ferida. Paralelamente a essa etapa, os fibroblastos iniciam a síntese de metaloproteinases (MMP) para remodelar a matriz colágena, e produzem MEC contendo colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibronectina e ácido hialurônico, que será a base para a migração, adesão, proliferação e diferenciação das células epidermais^{2,28}. O EGF é um importante fator de crescimento nessa etapa, pois induz a migração e a multiplicação das células da epiderme¹⁸. As células do estroma desempenham papel importante na reepitelização da pele, pois liberam quimiocinas, como a fator derivado de estroma 1 (SDF-1), que estimula a migração e a proliferação de células tronco epidermais para o sítio da lesão²⁹.

2.2.3. Fase de maturação e remodelamento

A MEC sintetizada pelos fibroblastos passa por modificações e remodelamento, de forma que o resultado do reparo depende do equilíbrio entre a síntese e a degradação da MEC. Essa última etapa da cicatrização conta com a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, com deposição de actina do músculo liso, levando à contração da ferida. Há ainda substituição do colágeno tipo III pelo de tipo I na MEC produzida, o que confere maior força tênsil à cicatriz. O colágeno tipo I possui fibras maiores em tamanho e número e grande quantidade de ligações entre as mesmas. Ao final ocorre a remoção de células e vasos sanguíneos desnecessários^{18,19,30}. Esse remodelamento é realizado por MMP, que podem clivar colágenos fibrilares (colagenases - MMP-1, 8 e 13), colágeno amorfo e fibronectina (gelatinases- MMP-2 e 9) e outras proteínas como proteoglicanos e laminina (estromeselinases- MMP-3, 7 e 10, que também degradam fibronectina e colágeno amorfo)¹².

As MMP são sintetizadas por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais. Sua transcrição é regulada por fatores de crescimento e citocinas, e são produzidas como precursores inativos, que necessitam entrar em contato com proteases no local da lesão para que ocorra sua ativação. Dessa forma, as MMP atuam na área da lesão remodelando a MEC e sua atividade é controlada pelos inibidores de metaloproteinases (TIMP), produzidos por células mesenquimais^{12,31}.

2.3. Ozonioterapia

2.3.1. Contextualização histórica da ozonioterapia

O ozônio foi descoberto em 1840, quando constatou-se a formação de um gás de odor pungente a partir da interação entre descargas elétricas e o oxigênio³². Devido a característica olfativa marcante, atribuiu-se ao referido gás o nome ozônio, do grego *ozein*, que significa "aquilo que cheira"¹⁰. Com o advento do primeiro gerador de ozônio, as aplicabilidades desse gás começaram a ser descobertas. Em princípio constatou-se sua potente e ampla propriedade antimicrobiana, sendo então utilizado no tratamento da água. Posteriormente, o ozônio passou a ser utilizado no tratamento de efluentes, esterilização de instrumentos, higienização de ambientes e na desinfecção de alguns produtos alimentícios^{33,34}. A primeira aplicação do ozônio como agente terapêutico ocorreu durante a primeira guerra mundial, entre os anos de 1914 e 1918. Anos depois, em 1958, o físico Joachim Hansler criou o primeiro gerador capaz de produzir o gás em concentrações conhecidas, permitindo estabelecer doses e facilitando seu emprego terapêutico¹⁰.

A ozonioterapia enfrentou muitos obstáculos ao seu desenvolvimento. O uso empírico por pessoas incapacitadas resultou em falhas na prática da técnica, como a aplicação de grandes volumes de gás na corrente sanguínea e consequente embolia pulmonar. Ainda, fatores como falta de padronização dos procedimentos, uso de geradores de ozônio sem instrumentos de controle, escassez de dados científicos e a toxicidade do ozônio desacreditaram a utilização do ozônio na prática médica, realidade que vem mudando com o tempo^{7,32}. Para uso medicinal deve ser utilizado oxigênio puro, visando garantir a pureza da mistura gasosa oxigênio/ozônio obtida ao final do processo, a qual é composta por até 5% de ozônio e 95% de oxigênio. Utilizar ar atmosférico, que contém aproximadamente 78% de nitrogênio, resulta em mistura gasosa com concentrações variáveis de óxidos de nitrogênio, que apresentam potencial tóxico e diminuem a eficácia da ozonioterapia⁸.

2.3.2. Ozônio: propriedades físico-químicas, finalidade e toxicidade

O ozônio é a forma alotrópica triatômica do oxigênio (O_3) e seus três átomos estão organizados em estrutura cíclica. Apresenta cheiro característico e coloração ligeiramente azulada, sendo mais instável, mais oxidante e dez vezes mais solúvel em água que a forma diatômica do oxigênio (O_2). Por ser uma molécula altamente reativa e instável, decompõe-se espontaneamente, o que torna seu armazenamento difícil. Em água, a temperatura e a presença de íons interferem na velocidade de depleção do ozônio. Baixas temperaturas e pequenas concentrações iônicas aumentam sua meia vida, enquanto altas temperaturas e grandes concentrações iônicas a diminuem³⁴.

O ozônio está naturalmente presente na estratosfera, localizada a aproximadamente 22 km acima da superfície terrestre, onde forma a camada de ozônio, indispensável à manutenção da vida, pois age como filtro para a radiação ultravioleta (UV) emitida pelo sol^{33,35}. Apesar de extremamente benéfico sob o ponto de vista de proteção à vida no planeta, o ozônio só é desejável na estratosfera. Esse gás passa a ser prejudicial quando presente na troposfera, estrato atmosférico mais próximo à superfície terrestre e que contém o ar que respiramos. O que se observa é que o aumento da poluição do ar com substâncias derivadas de emissões antropogênicas, como monóxido de carbono (CO), metano (CH_4), compostos ácidos como o ácido sulfúrico e, sobretudo, NO e dióxido de nitrogênio (NO_2) (Figura 3), favorecem a formação de ozônio na troposfera³⁶.

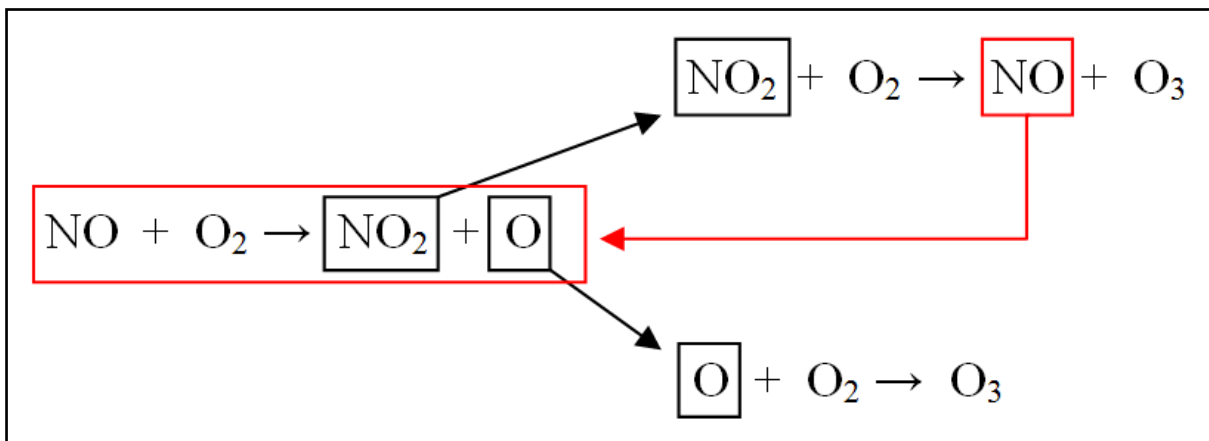


FIGURA 3 - Reações envolvendo os poluentes NO e NO_2 na atmosfera e a consequente formação de ozônio (O_3) na troposfera.

O ozônio é um poluente extremamente nocivo, exercendo efeito prejudicial tanto em pessoas e animais com alterações respiratórias preexistentes, como também naqueles saudáveis. A exposição ao ozônio deve ser conduzida de forma cautelosa, tomando o devido

cuidado de não o inalar, já que seus efeitos podem culminar na morte. Com isso, o uso inadequado, somado a sua toxicidade, contribuíram para a estigmatização do ozônio³⁷⁻⁴⁰. É importante destacar que o limiar entre a ação terapêutica e a toxicidade do ozônio baseia-se nas vias e formas de aplicação e no estabelecimento da dose, o que não é exceção para outros agentes terapêuticos e fármacos⁴¹.

Para evitar intoxicação pela inalação do ozônio é possível adotar medidas que incluem controle da ventilação local e instalação de aspiradores de ar acoplados a destruidores de ozônio, assim como de sensores de monitoramento com alarme. Por outro lado, o odor do ozônio é perceptível a partir de 0,01 ppmv e é preconizado que é possível trabalhar em ambientes com concentrações seis vezes mais altas (0,06 ppmv) por até oito horas, condição em que o odor do ozônio é marcadamente mais forte. Embora não seja o ideal, na ausência de mecanismos tecnológicos, o olfato é o melhor aliado para evitar a intoxicação, além da observação de sintomas relacionados à toxicidade. Em casos de intoxicação, é possível aplicar, por via intravenosa, ácido ascórbico e glutatona reduzida para limitar o dano oxidativo causado nas vias respiratórias^{8,9}.

2.3.3. Mecanismos de ação do ozônio

O ozônio apresenta grande solubilidade e dissolve com facilidade em contato com o plasma sanguíneo, o líquido extracelular e a água de cobertura da pele e das mucosas. Devido ao seu grande poder oxidativo, reage instantaneamente com várias biomoléculas, processo que se divide em dois momentos fundamentais, as reações primária e secundária. A reação primária do ozônio é caracterizada pela ação de antioxidantes que, embora sejam capazes de conter a reatividade injuriosa do ozônio, permitem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que ativam vias bioquímicas e são neutralizadas em seguida pelo sistema antioxidante. A reação secundária é caracterizada pela peroxidação lipídica. A interação do ozônio com lipídios de biomoléculas resulta na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um ERO, e aldeídos variados, que são produtos lipídico-oxidantes (PLO)^{32,42}.

Essas reações ocorrem rapidamente, consumindo todo o ozônio aplicado. Todos os eventos bioquímicos e celulares que ocorrem desse ponto em diante são coordenados pelas ERO e pelos PLO, que atuam como mensageiros do ozônio. As ERO apresentam efeito transitório, enquanto os PLO são moléculas de maior estabilidade e duração, capazes de produzir efeitos duradouros. Por isso, os PLO apresentam maior capacidade de difusão, podendo agir sistemicamente, dependendo da forma de aplicação do ozônio^{10,41}.

Dentre as ERO estão o ânion superóxido (O_2^-), NO, peroxinitrito ($O=NOO^-$), radical hidroxila (OH^-), ácido hipocloroso (HClO) e o H_2O_2 , que apresentam potencial citotóxico. Contudo, a meia vida dessas ERO é de frações de segundo e o sistema antioxidante pode neutralizá-los rapidamente, desde que a concentração não seja excessiva. Dentre os PLO estão o radical peroxil (ROO^-), hidroperóxidos (R-OOH), malondialdeído e alquenais, todos com potencial citotóxico e alguns reconhecidos como marcadores de estresse oxidativo (desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, com sobreposição dos oxidantes). O princípio da ozonioterapia é justamente criar uma situação momentânea de estresse oxidativo, sem efeitos deletérios, mas suficiente para ativar respostas terapêuticas no organismo^{9,42}.

Ao analisar a ação do H_2O_2 , que é o principal dentre as ERO, observa-se a ação positiva de um componente potencialmente nocivo. Assim que a peroxidação lipídica inicia, os níveis de H_2O_2 aumentam, gerando um gradiente de concentração que permite que essa molécula rapidamente penetre no citoplasma. Tanto o H_2O_2 no plasma quanto no interior das células é rapidamente reduzido por enzimas como catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona reduzida (GSH) livre⁷. O breve momento em que o H_2O_2 permanece dentro das células não gera danos, mas ativa respostas celulares interessantes. O H_2O_2 age como molécula sinalizadora capaz de ativar tirosinas quinases que, além de comporem as enzimas receptoras de insulina e os receptores fatores de crescimento epidérmico (EGFR), fibroblástico (FGFR), derivado de plaquetas (PDGFR) e endotelial vascular (VEGFR), é responsável por fosforilar e ativar o fator nuclear kappa beta (FNKB), envolvido na resposta celular imune e inflamatória. O FNKB é ativado frente a estímulos de radicais livres e também de estresse, citocinas, radiação UV e antígenos bacterianos e virais. Dessa forma, atua estimulando sistemas de defesa endógenos, a exemplo do aumento na produção de enzimas antioxidantes, melhora na resposta imune pela ativação leucocitária e liberação de fatores de crescimento e citocinas envolvidos no reparo tecidual⁴³⁻⁴⁵.

Especificamente nos eritrócitos, a entrada de ERO diminui discretamente o pH intracelular, o que aumenta a disponibilidade de oxigênio para os tecidos devido ao efeito de Bohr. As ERO também podem aumentar os níveis de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), o que diminui a afinidade entre a hemoglobina e o oxigênio e atua igualmente aumentando sua disponibilidade. Além disso, o NO é uma ERO que apresenta atividade vasodilatadora e também estimula a angiogênese, otimizando ainda mais a entrega de oxigênio, sobretudo em doenças isquêmicas e na fase proliferativa do reparo tecidual^{32,46,47}.

Quanto aos PLO, muito se sabe sobre sua toxicidade. No entanto, em concentrações submicromolares (0,01 - 0,5 mmol) estimulam a proliferação celular e

atividades bioquímicas benéficas. Sua ação é definida, portanto, a partir da concentração final e da capacidade antioxidante do tecido em que se encontra. Logo, aplicações de ozônio que apresentam efeito local devem ser realizadas com doses menores. Doses maiores devem ser aplicadas quando se busca efeito sistêmico, que utilizará obrigatoriamente o sangue para difundir os PLO. No sangue, a probabilidade de desenvolver toxicidade é muito pequena devido a fatores como a rápida diluição dos PLO na corrente sanguínea, que apresenta ampla capacidade antioxidante, neutralizando seu potencial tóxico e permitindo que a dose farmacológica seja alcançada. Ainda, os PLO são excretados via urina e bile com o tempo^{8,9}.

Como citado, os PLO apresentam grande difusão e podem agir em vários órgãos. Nesse contexto, é interessante destacar que, na medula óssea, agem como mensageiros do estresse oxidativo e induzem resposta adaptativa, que consiste no estímulo a formação de novos eritrócitos com maior concentração de 2,3-DPG e enzimas antioxidantes, que aumentam a disponibilidade de oxigênio para os tecidos^{33,46}.

Neste sentido, existe indicação de ozonioterapia para doenças que causam estresse oxidativo. Nas enfermidades em que o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é estabelecido, o estresse oxidativo é constante e se torna crônico. Com a ozonioterapia, essa constância é quebrada, transformando o estresse oxidativo crônico em agudo, e as ERO e os PLO liberados aumentam a ativação do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), responsável por estimular os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático. A abordagem deve ser realizada com cautela, utilizando a menor dose no início e aumentá-la gradativamente, a fim de garantir que a agudização do processo seja transitória e reversível^{42,48-50}. Além disso, a ozonioterapia aplicada com periodicidade induz as células a produzir proteínas do choque térmico (HSP, do inglês *heat stress proteins*), proteínas reguladas por glicose (GRP, do inglês *glucose-regulated proteins*) e proteínas de choque oxidativo (OSP, do inglês *oxidative shock proteins*), que aumentam a resistência do organismo ao estresse oxidativo^{45,51}.

2.3.4. Vias de aplicação da ozonioterapia

A ozonioterapia conta com várias vias de aplicação, tanto parenterais (intravenosa, intra-arterial, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intrapleural) quanto tópicas e locorregionais (auricular, oral, vaginal, uretral, retal e cutânea). Todas possibilitam a aplicação do ozônio sem risco de intoxicação. A única via que não pode ser utilizada sob qualquer hipótese é a inalatória. Vale ressaltar que as vias intravenosa e intra-arterial utilizam sangue ou soluções ozonizadas, mas não a mistura gasosa de oxigênio e ozônio. Essa prática

foi abolida desde 1984 devido a várias mortes em decorrência de embolia pulmonar^{8,32}. A aplicação em vasos sanguíneos visa a melhora sistêmica do paciente, estimulando o aumento da disponibilidade de adenosina trifosfato (ATP), oferta de oxigênio e ativando a imunidade⁴⁶.

A ozonioterapia aplicada por meio da auto-hemoterapia consiste na retirada de certo volume de sangue, exposição deste à mistura de oxigênio e ozônio e agitação lenta por cinco minutos. Essa técnica divide-se em auto-hemoterapia maior e menor. A diferença entre ambas reside em dois fatores, o volume de sangue utilizado e a via de aplicação. Em humanos, na auto-hemoterapia maior o volume a ser utilizado varia entre 50-270 ml de sangue e a via de aplicação é intravenosa. Já a auto-hemoterapia menor consiste na utilização de 5-10 ml de sangue, sendo a aplicação via intramuscular^{52,53}.

A insuflação retal é capaz não somente de realizar efeitos locais, mas os PLO formados na interação com a mucosa são capazes de penetrar nas vias linfática e sanguínea e assim exercer efeito sistêmico, com resultados semelhantes aos da auto-hemoterapia maior^{49,54}. Tanto a via intramuscular quanto a subcutânea podem ser também utilizadas para a aplicação do ozônio. A dose nesses casos deve ser pequena e/ou subdividida em diferentes sítios de aplicação. São técnicas que apresentam efeito sistêmico e algum efeito local, sobretudo a subcutânea. Já as aplicações intraperitoneais e intrapleurais podem ser realizadas através de lavagem com água ozonizada e insuflação com volumes relativamente grandes de mistura gasosa (>300 ml), o que não causa desconforto nem prejudica as membranas serosas. Sua utilização é descrita para o tratamento de infecções intracavitárias e para otimizar o reparo de feridas em estruturas no mesmo local⁵⁵⁻⁵⁷.

As aplicações locais podem ser realizadas tanto com a mistura gasosa, como com água e óleos ozonizados. Infecções vaginais, retais e vesicais respondem bem à ozonioterapia. Nesses casos, a lavagem com água ozonizada para a remoção de secreções e limpeza é indicada, seguida de insuflações com gás. Pessários e supositórios com óleo ozonizado também são utilizados^{11,58}.

A aplicação tópica cutânea pode ser realizada em qualquer tipo de lesão, incluindo traumas, queimaduras, úlceras e feridas infeccionadas ou limpas. Pode ser utilizado gás, que deve ser mantido na área a ser tratada com o auxílio de um saco (*bagging*) ou recipiente (*cupping*) resistente a ozônio, de forma a evitar a inalação do mesmo. A umidificação da pele para o procedimento auxilia na sua eficácia, pois facilita a reação do ozônio. Irrigação ou utilização de gazes embebidas com água ozonizada e aplicação de óleo ozonizado também podem ser realizadas, com bons resultados^{10,59}.

2.3.5. Água e óleo ozonizados

A utilização de soluções ozonizadas, especificamente água e óleo, é extremamente prática, pois permite a aplicação tópica do ozônio sem o risco de inalação, o que pode ocorrer quando da utilização direta do gás. Além disso, o gás solubilizado nesses veículos age de forma mais efetiva quando aplicado sobre a pele, pois o ozônio reage melhor em ambiente úmido^{33,60-62}.

Para a produção da água ozonizada é necessário utilizar água pura bidestilada e deionizada. Isso permite prever a concentração final de ozônio e evita a formação de compostos tóxicos quando da interação do ozônio com íons. A produção da água ozonizada se dá por borbulhamento do ozônio na água pura por pelo menos cinco minutos. A concentração final será equivalente a 25% da concentração de ozônio na mistura gasosa borbulhada. Por exemplo, borbulhar ozônio a 100 mcg/ml durante cinco minutos em água pura originará água ozonizada na concentração de 25 mcg/ml⁸. O acondicionamento da água ozonizada deve ser em recipientes de vidro com tampas em silicone ou teflon, e sob refrigeração. O ideal é que se utilize a solução imediatamente após sua produção, porém mantê-la a 7°C confere meia vida útil de 110 horas. Já a 20°C, a meia vida do ozônio reduz a nove horas⁷.

Vários tipos de óleos vegetais podem ser ozonizados, comumente os de girassol e oliva. A ozonização de óleos produz peróxidos e a quantificação destes indica o grau de ozonização. O óleo ozonizado foi primeiramente produzido em Cuba e empregado no tratamento de úlceras, infecções parasitárias, bacterianas e virais, e não somente pela via tópica, mas também oral. Ainda hoje não há protocolo padrão para a ozonização de óleos. O que se sabe é que ozonizações prolongadas, de dois dias, promovem a solidificação do óleo, em que cada grama de óleo é capaz de conter 160 mg de ozônio. Sob refrigeração o produto se mantém estável por até dois anos e, ao utilizá-lo, realiza-se a diluição com óleo puro^{10,59}.

A ação exata do óleo ozonizado ainda não está elucidada. Acredita-se que o ozônio no óleo é disponibilizado gradativamente e, ao dissolver na água presente no local da aplicação, gera H₂O₂ e PLO, o que explica o efeito desinfetante prolongado e a atividade estimulante. De acordo com Bocci¹⁰, caso o objetivo seja auxiliar a cicatrização de feridas, devem ser produzidos óleos com concentrações altas, médias e baixas de peróxidos, os quais serão utilizados de acordo com as diferentes fases da cicatrização. No entanto, o autor não cita as concentrações. Em contrapartida, em um trabalho mais recente⁶⁴ três concentrações de peróxidos foram testadas (949, 1631 e 3170 mEq/kg) e a concentração média de peróxido

demonstrou melhor efeito sobre a cicatrização nos primeiros sete dias, promovendo maior retração e neovascularização na ferida.

A água ozonizada apresenta excelente eficácia no tratamento de feridas. A concentração de 20 mcg/ml é adequada ao tratamento de feridas contaminadas, auxiliando na remoção do pus, material necrótico e bactérias. No entanto, à medida que o reparo tecidual por cicatrização avança, a dose do ozônio na água deve ser reduzida a aproximadamente 5 mcg/ml, o que garante efeito profilático contra novas infecções e auxilia nas fases de proliferação e remodelamento da cicatrização^{11,58}.

Sobre os efeitos profiláticos e terapêuticos da água e do óleo ozonizados contra infecções por microrganismos, um estudo mostrou que ambos possuem ação bactericida *in vitro* e *in vivo* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, um microrganismo comumente envolvido em infecções de feridas cutâneas, incluindo as cepas MRSA (do inglês *methicillin resistant Staphylococcus aureus*), que são resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos. A exposição ao óleo ozonizado foi capaz de eliminar 100% das cepas padrão em cinco minutos e cepas MRSA em 15 minutos, enquanto a água ozonizada eliminou 100% de ambas as cepas com apenas um minuto de exposição⁶⁵. Isso reforça a vantagem do ozônio sobre esses microrganismos sem induzir resistência. Outro fato interessante é que a ozonioterapia tópica possui efeito antimicrobiano com menor toxicidade para as células do tecido. Isso foi observado na comparação entre dosagens de ozônio (0,25 a 8 mcg/mL em solução salina) e clorexidina a 0,2%, onde culturas de queratinócitos e fibroblastos apresentaram maior viabilidade quando expostas ao ozônio e menor viabilidade com a clorexidina⁵⁹.

Ainda acerca da ozonioterapia tópica com água e óleo ozonizados, estes são comumente utilizados em feridas crônicas, sobretudo graças a sua capacidade de potencializar a oxigenação do tecido pela exposição ao O₃ e criar o estímulo necessário para a liberação de fatores de crescimento pela ativação do FNKB. No entanto, estudos mostram a efetividade da ozonioterapia também na cicatrização de feridas cutâneas agudas, o que reforça a necessidade de determinar a dose exata na qual o ozônio pode ou não contribuir para o reparo tecidual em diferentes situações⁶⁶.

REFERÊNCIAS

1. Ackermann MR. Inflammation and Healing. In: Zachary JF, editor. Pathologic basis of veterinary disease. 6th ed. Saint Louis: Elsevier; 2017. p. 73–131.
2. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. Eur Surg Res. 2012; 49(1):35–43.
3. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Muller and Kirk's small animal dermatology.

- 7th ed. Elsevier; 2013.
4. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*. 2017; 356(6342):1026–1030.
 5. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453(7193):314–321.
 6. Pereira ÂL, Bachion MM. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. *Rev Bras Enferm*. 2005; 58(2):208–213.
 7. Zanardi I, Borrelli E, Valacchi G, Travagli V, Bocci V. Ozone: A Multifaceted Molecule with Unexpected Therapeutic Activity. *Curr Med Chem*. 2016; 23(4):304–314.
 8. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch Med Res*. 2006; 37(4):425–435.
 9. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 216(3):493–504.
 10. Bocci, V. *Ozone: a new medical drug*. Netherlands: Springer, 2005.
 11. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol*. 2018; 56:235–241.
 12. Abbas AK, Lichtmann AH. Inflamação e reparo. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins Patologia Básica*. 9th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p. 29–73.
 13. Wang J, Dodd C, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Lab Investig*. 2008; 88(12):1278–1290.
 14. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2004; 200(1):134–145.
 15. Ali-Bahar M, Bauer B, Tredget EE, Ghahary A. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen*. 2004; 12(2):175–182.
 16. Kwan PO, Tredget EE. Biological Principles of Scar and Contracture. *Hand Clin*. 2017; 33(2):277–292.
 17. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanism, signaling and translation. *Sci Transl Med*. 2014; 6(265):1–36.
 18. Pang C, Ibrahim A, Bulstrode NW, Ferretti P. An overview of the therapeutic potential of regenerative medicine in cutaneous wound healing. *Int Wound J*. 2017; 14(3):450–459.
 19. Serra MB, Barroso WA, Silva NN, Silva SDN, Borge ACR, Abreu IC, Borges MODR. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *Int J Inflam*. 2017; 2017:3406215.
 20. Galván-Peña S, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014; 5(420):1–7.
 21. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic

- wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012; 25(7):304–314.
22. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*. 2016; 60(3):275–301.
 23. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(3):159–175.
 24. Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*. 2016; 16(6):378–391.
 25. Landén NX, Li D, Stähle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73(20):3861–3885.
 26. DiPietro LA. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Curr Opin Rheumatol*. 2013; 25(1):87-91.
 27. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18(7):816–827.
 28. Levinson H. A Paradigm of Fibroblast Activation and Dermal Wound Contraction to Guide the Development of Therapies for Chronic Wounds and Pathologic Scars. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(4):149–159.
 29. Guo R, Chai L, Chen L, Chen W, Ge L, Li X, Li H, Li S, Cao C. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) accelerated skin wound healing by promoting the migration and proliferation of epidermal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015; 51(6):578–585.
 30. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma*. 2012; 2(1):18–28.
 31. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(7):379–388.
 32. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozone therapy : an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res*. 2017; 7(3):212-219.
 33. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med*. 2011; 2(1):66-70.
 34. Qin S, Cheng L, Selorm AL, Yuan F. An Overview of Ozone Research. *J Adv Oxid Technol*. 2018; 21(1):297-302.
 35. Andersen SO, Halberstadt ML, Borgford-Parnell N. Stratospheric ozone, global warming, and the principle of unintended consequences - An ongoing science and policy story. *J Air Waste Manag Assoc*. 2013; 63(6):607–647.
 36. Fanizza C, De Berardis B, Ietto F, Soggiu ME, Schirò R, Inglessis M, Ferdinandi M, Incoronato F. Analysis of major pollutants and physico-chemical characteristics of PM_{2.5} at an urban site in Rome. *Sci Total Environ*. 2018; 616–617:1457–1468.
 37. Bhalla DK, Gupta SK. Lung Injury, Inflammation, and Inflammatory Stimuli in Rats Exposed To Ozone. *J Toxicol Environ Health A*. 2000; 59(4):211–228.
 38. Cho HY, Zhang LY, Kleeberger SR. Ozone-induced lung inflammation and hyperreactivity are mediated via tumor necrosis factor-alpha receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 280(3):L537-546.

39. Savov JD, Whitehead GS, Wang J, Liao G, Usuka J, Peltz G, Foster WM, Schwartz DA. Ozone-induced acute pulmonary injury in inbred mouse strains. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31(1):69–77.
40. Tager IB, Balmes J, Lurmann F, Ngo L, Alcorn S, Künzli N. Chronic Exposure to Ambient Ozone and Lung Function in Young Adults. *Epidemiology*. 2005; 16(6):751–759.
41. Bocci VA. Tropospheric Ozone Toxicity vs. Usefulness of Ozone Therapy. *Arch Med Res*. 2007; 38(2):265–267.
42. İnal M, Dokumacioglu A, Özcelik E, Ucar O. The effects of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. *Ir J Med Sci*. 2011; 180(3):703–707.
43. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*. 2000; 486(1):10–13.
44. Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*. 2002; 9(4):231–238.
45. Kucukgul A, Erdogan S, Gonenci R, Ozan G. Beneficial effects of nontoxic ozone on H₂O₂-induced stress and inflammation. *Biochem Cell Biol*. 2016; 94(6):577–583.
46. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm*. 2000; 9(6):271–276.
47. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med*. 2011; 9:66.
48. Bocci V, Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem*. 2015; 3:1–6.
49. Delgado-Roche L, Riera-Romo M, Mesta F, Hernández-Matos Y, Barrios JM, Martínez-Sánchez G, Al-Dalaien SM. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *Eur J Pharmacol*. 2017; 15:148–154.
50. Re L, Martínez-Sánchez G, Bordicchia M, Malcangi G, Pocognoli A, Morales-Segura MA, Rothchild J, Rojas A. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur J Pharmacol*. 2014; 742:158–162.
51. Dattilo S, Mancuso C, Koverech G, Di Mauro P, Ontario ML, Petralia CC, Petralia A, Maiolino L, Serra A, Calabrese EJ, Calabrese V. Heat shock proteins and hormesis in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases. *Immun Ageing*. 2015; 12:20.
52. Bocci V. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch Med Res*. 2006; 37(4):425–435.
53. Tremblay J, Chen H, Peng J, Kunes J, Vu MD, Der Sarkissian S, deBlois D, Bolton AE, Gaboury L, Marshansky V, Gouadon E, Hamet P. Renal ischemia-reperfusion injury in the rat is prevented by a novel immune modulation therapy. *Transplantation*. 2002; 74(10):1425–1433.
54. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep*. 2005; 10(3):121–130.

55. Chen Z, Liu X, Yu G, Chen H, Wang L, Wang Z, Qiu T, Weng X. Ozone therapy ameliorates tubulointerstitial inflammation by regulating TLR4 in adenine-induced CKD rats. *Ren Fail.* 2016; 38(5):822–830.
56. Çakir T, Aslaner A, Tekeli SO, Avci S, Doğan U, Tekeli F, Soylu H, Akyüz C, Koç S, Üstünel I, Yılmaz N. Effect of ozone on colon anastomoses in rat peritonitis model. *Acta Cir Bras.* 2016; 31(2):111–118.
57. Luo W, Yang F, Yang F, Sun W, Zheng W, Wang XL, Wu FF, Wang JL, Wang JS, Guan SM, Chen J. Intervertebral Foramen Injection of Ozone Relieves Mechanical Allodynia and Enhances Analgesic Effect of Gabapentin in Animal Model of Neuropathic Pain. *Pain Physician* 2017; 20(5):E673–686.
58. Mete F, Tarhan H, Celik O, Akarken I, Vural K, Ekin RG, Aydemir I, Ilbey YO. Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian J Androl.* 2017; 19(1):43–46.
59. Borges GÁ, Elias ST, Silva SM, Magalhães PO, Macedo SB, Ribeiro AP, Guerra EN. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017; 45(3):364–370.
60. Moureu S, Violleau F, Ali Haimoud-Lekhal D, Calmon A. Ozonation of sunflower oils: Impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. *Chem Phys Lipids.* 2015; 186:79–85.
61. Khatri I, Moger G, Kumar NA. Evaluation of effect of topical ozone therapy on salivary Candidal carriage in oral candidiasis. *Indian J Dent Res.* 2015; 26(2):158–162.
62. Tara F, Zand-Kargar Z, Rajabi O, Berenji F, Akhlaghi F, Shakeri MT, Azizi H. The Effects of Ozonated Olive Oil and Clotrimazole Cream for Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. 2016; 22(4):44-49.
63. Zanardi I, Burgassi S, Paccagnini E, Gentile M, Bocci V, Travagli V. What is the best strategy for enhancing the effects of topically applied ozonated oils in cutaneous infections? *Biomed Res Int.* 2013; 2013:6.
64. Valacchi G, Lim Y, Belmonche G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V, Travagli I. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair Regen.* 2011; 19(1):107–115.
65. Song M, Zeng Q, Xiang Y, Gao L, Huang J, Huang J, Wu K, Lu J. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol Med Rep.* 2018; 17(2): 2449-2455.
66. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci.* 2009; 24(3):368–374.

CAPÍTULO 2 - SOLUÇÕES OZONIZADAS FAVORECEM O REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM RATOS

OZONIZED SOLUTIONS FAVOR THE REPAIR OF SKIN WOUNDS EXPERIMENTALLY INDUCED IN RATS

RESUMO: Este estudo avaliou e comparou os efeitos da água e do óleo ozonizados sobre o reparo tecidual de feridas experimentalmente induzidas em ratos. Foram utilizados 48 ratos albinos, da linhagem Wistar, nos quais foi produzida uma ferida de 9 mm de diâmetro no dorso, entre as escápulas. As feridas foram tratadas uma vez ao dia com água ozonizada (GA, N=12), óleo ozonizado (GO, N=12), creme de alantoína a 0,2% (GAL, N=12) e cloreto de sódio a 0,9% (GCL, N=12). As feridas foram submetidas à análise morfométrica aos dias zero, três, oito, 15 e 22, após indução. Para a avaliação microscópica das feridas, três ratos de cada grupo foram submetidos à eutanásia nos dias três, oito, 15 e 22 após a indução das mesmas. As análises microscópicas foram complementadas pelas técnicas de *picrosirius red* e imunomarcagem de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), para a quantificação de colágeno e neovascularização, respectivamente. À avaliação morfométrica a ferida dos ratos dos grupos GA e GCL apresentou maior grau de retração ($p>0,05$) aos dias três e oito após indução da lesão. À avaliação histopatológica a ferida dos animais do grupo GA apresentou os menores índices de acantose. Na coloração de *picrosirius red* mostrou que os grupos GA e GO apresentaram maior deposição de colágeno total e de colágeno do tipo I aos 15 e aos 22 dias de tratamento, respectivamente. Já a variável neovascularização foi maior ($p<0,05$) nas feridas do grupo GO nos dias três, oito e 15, o que fora ratificado à imunoistoquímica, com maior imunomarcagem de VEGF nas feridas do grupo GO ($p<0,05$) aos dias oito e 15, em relação àquelas dos tratamentos com GA e GCL, respectivamente, e maior que ambos aos 22 dias. Conclui-se que a água e o óleo ozonizados, nas concentrações testadas, favorecem o processo de reparo tecidual em feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos. A água ozonizada potencializa a retração da ferida, bem como promove melhor organização do epitélio e acelera a entrada da cicatrização na fase de maturação e remodelamento, levando em consideração a maior deposição de colágeno do tipo I aos 15 dias e menor vascularização aos 22 dias após o início do tratamento; enquanto o óleo ozonizado à concentração de 418,48 mEq/kg de peróxidos promove maior neovascularização durante o reparo tecidual e maior deposição de colágeno do tipo I a partir da terceira semana de tratamento.

Palavras-chave: água ozonizada, cicatrização, óleo ozonizado, ozonioterapia, pele.

ABSTRACT: This study evaluated and compared the effects of ozonated water and ozonated oil on the tissue repair of experimentally induced wounds in rats. A total of 48 albino Wistar rats were used, in which a 9 mm diameter wound was performed on the back, between the scapulae. Wounds were treated once daily with ozonated water (GA, N = 12), ozonated oil (GO, N = 12), 0.2% allantoin cream (GAL, N = 12) and 0.9% sodium chloride (GCL, N = 12). The wounds were submitted to morphometric analysis at days zero, three, eight, 15 and 22, after induction. For the microscopic evaluation of the wounds, three rats from each group were submitted to euthanasia on days three, eight, 15 and 22 after their induction. Microscopic analyzes were complemented by picosirius red and vascular endothelial growth factor (VEGF) immunostaining techniques for the quantification of collagen and neovascularization, respectively. At the morphometric evaluation, the GA and GCL rats showed a greater degree of retraction ($p > 0,05$) at days three and eight after lesion induction. Histopathological evaluation of the wounds of the GA group presented the lowest rates of acanthosis. Picosirius red staining showed that groups GA and GO presented higher deposition of total collagen and type I collagen at 15 and 22 days of treatment, respectively. The neovascularization variable was higher ($p < 0.05$) in the GO group wounds on days three, eight and 15, which was ratified by immunohistochemistry, with higher VEGF immunostaining in the GO group wounds ($p < 0.05$). at 8 and 15 days, in relation to those of GA and GCL treatments, respectively, and higher than both at 22 days. It was concluded that ozone water and oil at the tested concentrations favor the tissue repair process in experimentally induced skin wounds in rats. in the maturation and remodeling phase, taking into account the greater deposition of type I collagen at 15 days and less vascularization at 22 days after treatment; while ozonized oil at 418,48 mEq/kg of peroxides promotes greater neovascularization during tissue repair, as well as greater deposition of type I collagen from the third week of treatment.

Key-words: ozonated oil, ozonated water, ozone therapy, skin, wound healing

INTRODUÇÃO

Diante de uma lesão, os tecidos iniciam eventos celulares e moleculares que, a depender da magnitude dos danos e do tipo tecidual, promoverão reparo por regeneração ou cicatrização. Na regeneração o tecido é totalmente restabelecido e na cicatrização há fibrose. A regeneração ocorre em duas fases, a inflamatória e a proliferativa, enquanto a cicatrização é acrescida da fase de maturação e remodelamento^{1,2}. Desordens nessas etapas limitam o reparo tecidual, levando à cronicidade da lesão e predispondo a cicatrizes extensas³. Esse e outros fatores, como a grande casuística das lesões cutâneas na clínica médica veterinária, impulsionam a busca por tratamentos que auxiliem o reparo tecidual⁴.

A ozonioterapia tem sido utilizada como adjuvante no tratamento de lesões, auxiliando o reparo tecidual de feridas de forma economicamente viável, pouco invasiva e sem efeitos colaterais^{5,6}. O ozônio, molécula instável e de forte efeito oxidante, elimina microrganismos sem causar resistência, diferente dos tratamentos com antimicrobianos⁷. Sua contribuição ao reparo tecidual ocorre por interação com fluidos orgânicos, gerando moléculas reativas de oxigênio e influenciando eventos bioquímicos celulares⁸. Contudo, se utilizado em subdose ou em excesso pode não apresentar resultados ou ser tóxico⁹.

Outros mecanismos do ozônio junto ao reparo tecidual incluem o incremento da oxigenação tecidual por aumento na capacidade dos eritrócitos em carrear oxigênio e produzir substâncias vasodilatadoras¹⁰, melhor resposta inflamatória local por estímulo à produção e liberação de citocinas como fator de necrose tumoral e interleucinas, que promovem a ativação de leucócitos; e induzida liberação de fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)^{9,11}.

O ozônio pode ser utilizado no tratamento de feridas cutâneas sob a forma gasosa ou dissolvido na água ou no óleo. A água ozonizada possui alto poder de permeabilidade e infiltração, sendo de fácil manipulação e aplicação em locais de difícil acesso. No entanto, devido à instabilidade do ozônio, suas propriedades microbicidas são rapidamente perdidas. Para evitar que isso ocorra, a água deve ser utilizada imediatamente após a ozonização, com a limpeza prévia do local, já que debris orgânicos também aceleram a perda da capacidade microbicida do ozônio¹². Estudos apontam que o óleo ozonizado possui eficácia no tratamento de fístulas, ferimentos pós-cirúrgicos e úlceras, atuando sobre patógenos sem danificar o epitélio¹³. O óleo difunde lentamente as moléculas de ozônio ao tecido graças à sua capacidade de estabilizar esse gás. Possui ainda ação microbicida, efeito desbridante, modula

a fase inflamatória e estimula a angiogênese e sistemas enzimáticos que favorecem o metabolismo do oxigênio⁹.

Contudo, embora as soluções ozonizadas sejam boas para o reparo tecidual, não há uma padronização de protocolo para o tratamento de feridas cutâneas. Diante disso, este estudo teve por objetivo verificar os efeitos da água e do óleo ozonizados sobre feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos, de forma a estabelecer um protocolo experimental que seja viável para aplicação clínica, elucidando em quais aspectos do reparo tecidual é vantajoso utilizar cada uma das soluções ozonizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil, sob protocolo número 079/2017. Foram utilizados 48 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, fêmeas, com peso corporal entre 250 a 300 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da UFG. Os animais foram agrupados em número de dois por caixa, separados por placa de acrílico transparente, em ambiente higienizado, climatizado (23°C), com ciclo de iluminação de 12 horas (claro/escuro), além de água e ração comercial para a espécie *ad libitum*. Os animais permaneceram em período de adaptação por dez dias antes do início do experimento.

Os animais foram aleatoriamente alocados em quatro grupos de 12 indivíduos cada, de acordo com os tratamentos com água ozonizada (GA), óleo ozonizado de girassol (GO), cloreto de sódio 0,9% (GCL - controle negativo) e creme de alantoína a 0,2% (GAL - controle positivo). Esses grupos foram subdivididos de acordo com momentos de eutanásia para a colheita das amostras destinadas a análise microscópica nos dias três, oito, 15 e 22 após a indução das feridas, totalizando 16 subgrupos com três animais cada (Figura 1).

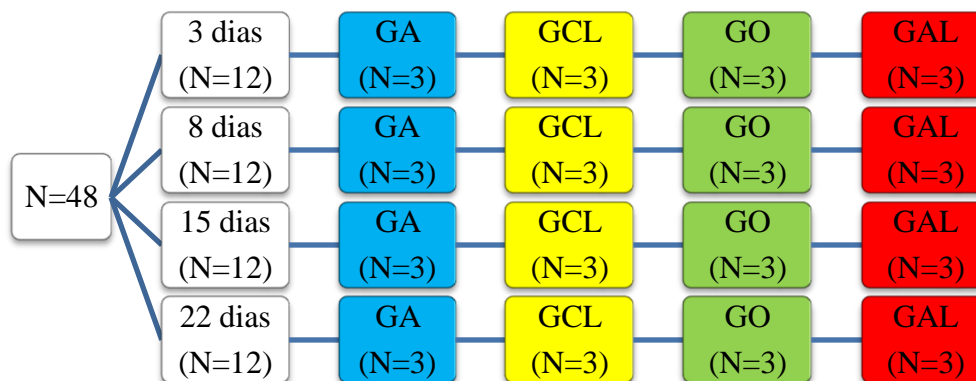


FIGURA 1 - Distribuição dos ratos em grupos e subgrupos de acordo com o tratamento e o momento da eutanásia e colheita das amostras para avaliação microscópica aos três, oito, 15 e 22 dias após a indução experimental das feridas. GA = água ozonizada (azul); GCL = cloreto de sódio a 0,9% (amarelo); GO = óleo ozonizado (verde); e GAL = creme de alantoína a 0,2% (vermelho).

Obtenção da água ozonizada, óleo ozonizado, creme de alantoína e cloreto de sódio

A água ozonizada foi produzida do gerador de ozônio modelo #O&L 1.5 RM, Ozone & Life, São José dos Campos, São Paulo, Brasil. Para isso, uma proveta de 100 mL foi preenchida com 50 mL de água bidestilada deionizada, à temperatura de 7°C, que, em seguida, foram submetidos a ozonização por borbulhamento por 15 minutos, com o aparelho ajustado para produzir ozônio na concentração de 62 mcg/mL. O protocolo utilizado permitiu alcançar a concentração final de 4,5 mcg de ozônio por mL de água¹⁴, verificada por meio do teste Vacu-Vials Ozônio 0-5 ppm (#K-7423 - CHEMetrics Inc., Midland, Virgínia, EUA).

O óleo ozonizado foi adquirido comercialmente, sendo utilizado o óleo ozonizado de girassol (Ozone & Life, São José dos Campos, São Paulo, Brasil), cujo índice de peróxidos era de 418,48 mEq/kg. O creme de alantoína a 0,2%, utilizado nas feridas dos animais do grupo controle positivo também foi adquirido comercialmente (Interdrogas, Goiânia, Goiás, Brasil), assim como o cloreto de sódio a 0,9%, utilizado nas feridas dos animais do grupo controle negativo (Laboratório Arboreto, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil).

Indução e tratamento das feridas

Para a indução das feridas, os animais foram submetidos a protocolo anestésico inalatório com isoflurano. Com o auxílio de um vaporizador, os animais foram induzidos ao plano anestésico utilizando-se a concentração de 5% em caixa de indução, e a manutenção foi realizada à concentração de 2% com o auxílio de máscara adaptada para a espécie. A área de tricotomia no dorso dos animais foi de aproximadamente 9cm², e a antissepsia realizada com

digluconato de clorexidina a 0,2% e álcool 70%. Cada ferida foi confeccionada com o auxílio de *punch* metálico de 9 mm de diâmetro, na região dorsal dos animais, entre as duas escápulas, utilizando a linha média do dorso como referência, de onde removeu-se um fragmento de pele que incluía epiderme, derme e subcutâneo. A profundidade da lesão foi padronizada a partir da visualização do tecido muscular. A analgesia no pré-operatório foi realizada com administração intraperitoneal de cloridrato de tramadol na dose de 12,5 mg/kg e mantida durante três dias, por via oral, pela administração de cloridrato de tramadol na água de consumo dos animais, na concentração de 1mg de tramadol para cada 1 mL de água.

A partir de 24 horas após a indução das feridas, os animais foram submetidos aos respectivos tratamentos, uma vez ao dia, com duração conforme distribuição dos animais nos grupos de eutanásia (três, oito, 15 e 22 dias). A ferida dos animais do grupo GA era irrigada com 3 mL de água ozonizada com o auxílio de uma seringa, durante 30 segundos e imediatamente após sua ozonização. Para diminuir o impacto da depleção do ozônio na água, um novo protocolo de ozonização era realizado antes da aplicação em cada um dos subgrupos tratados com água ozonizada. A ferida dos animais do grupo GCL era submetida a irrigação com cloreto de sódio a 0,9%, nos moldes utilizados para os grupos tratados com água ozonizada. Já a ferida dos animais do grupo GO foi tratada com 50 µl de óleo ozonizado e aquela dos animais do grupo GAL recebeu 150 mg de creme de alantoína a 0,2% sobre a área da ferida.

Morfometria macroscópica das feridas

A avaliação da retração das feridas foi realizada considerando o protocolo de eutanásia. Assim, foram avaliadas 48 feridas aos dias zero (dia da cirurgia) e dia três, 36 feridas ao dia oito, 24 feridas ao dia quinze e 12 feridas ao dia 22 após a indução das mesmas. Nos referidos momentos cada ferida foi fotografada com uma câmera (Sony® SLT-A35), sob iluminação artificial e distância padronizada (25 cm). As imagens foram exportadas ao programa de análise de imagens Image J (NIH), versão 1.3.1, com a escala ajustada pela ferramenta *set scale*, tendo como base a escala de referência da foto, representada por uma régua posicionada no plano da ferida cutânea. Em seguida, com a ferramenta *free hand selection*, os limites da ferida foram demarcados e, a partir do comando *measure*, a área da ferida foi calculada em milímetros quadrados (mm²) (Figura 2). Para calcular o grau de retração da ferida, os valores foram transformados em porcentagem de acordo com a fórmula

$GRF = \frac{(AIF - AF^N)}{AIF} \times 100$, e submetidos à análise estatística, onde GRF = grau de retração da ferida; AIF = Área inicial da ferida; AF^N = Área da ferida no dia da fotografia (N = dia três, oito, 15 ou 22).

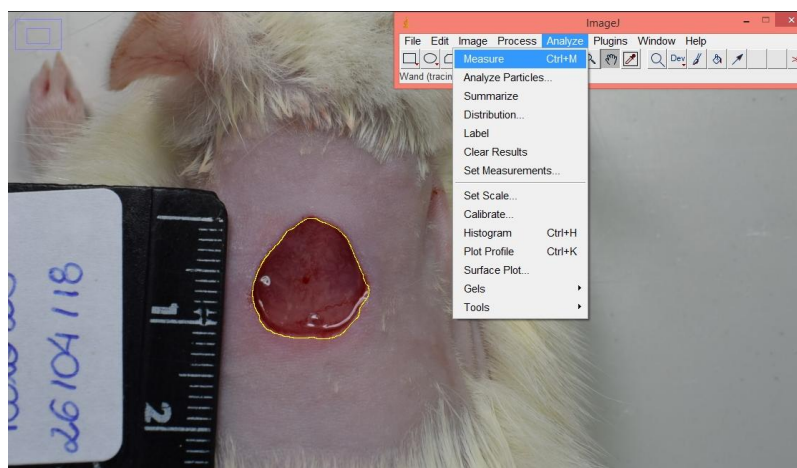


FIGURA 2 - Ferida induzida na pele de um rato. Bordas da ferida demarcadas com a ferramenta *free hand selection* (linha amarela), e o comando *measure* utilizado para o cálculo da área em mm².

Avaliação microscópica

Aos três, oito, 15 e 22 dias após a indução e tratamento diário das feridas, três animais de cada grupo (GA, GCL, GO e GAL) foram submetidos a eutanásia por meio de sobredose de isoflurano na maior concentração possível, com o auxílio de uma caixa de indução. Para a avaliação microscópica foi colhido um fragmento retangular da pele de cada animal, incluindo a totalidade da área da lesão e as bordas do tecido normal adjacente (1 cm de margem). Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada a 10% por 48 horas e, em seguida, transferidos para solução de álcool 70%, onde permaneceram até o momento do processamento histológico e inclusão em parafina. Foram confeccionados cortes histológicos de 5 µm, os quais foram distendidos sobre lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE).

A análise das variáveis histomorfológicas foi realizada às cegas, por dois avaliadores, utilizando microscópio óptico (BX41, Olympus). Os parâmetros avaliados incluíram reepitelização, tipo de matriz extracelular (MEC), neovascularização, acantose, infiltrado polimorfonuclear, infiltrado mononuclear e edema. Para a reepitelização foi atribuído o escore zero para feridas com ausência de reepitelização; escore um para feridas

com menos de 50% da área reepitelizada; escore dois para feridas com mais de 50% da área reepitelizada, mas incompleta; e escore três para reepitelização completa¹⁵. Quanto ao tipo de MEC foram atribuídos escores de um a três, sendo escore um representado por MEC vascular, com grande quantidade de vasos neoformados e fibroblastos imaturos, deposição discreta de fibras colágenas fracamente coradas, esparsas e aspecto ondulado; escore dois para MEC do tipo fibrovascular, com vasos neoformados, fibroblastos imaturos e maduros, deposição moderada de fibras colágenas mais agrupadas e eosinofílicas e, por vezes, com aspecto linear; e escore três para MEC fibrosa, representada por deposição acentuada de fibras colágenas acentuadamente eosinofílicas, espessas e alinhadas de forma compacta, com fibroblastos maduros e poucos vasos. Para a variável neovascularização foi realizada uma abordagem quantitativa calculando-se a média de vasos sanguíneos (estruturas tubulares com endotélio e hemácias no lúmen) contados em 10 campos à objetiva de 40x, de acordo com critérios adaptados de Valacchi⁹. Para o restante das variáveis foram atribuídos os escores zero (ausente), um (discreto), dois (moderado) e três (acentuado).

Para a quantificação das fibras colágenas foram confeccionadas lâminas histológicas submetidas à coloração *picrosirius red*. Fotomicrografias de 10 campos à objetiva de 40x foram capturadas utilizando um microscópio óptico com luz polarizada e uma câmera (Sony® NEX-3) acoplada. As imagens foram analisadas com o auxílio do software Image J (NIH), versão 1.3.1, utilizando a ferramenta *color threshold* para evidenciação da porcentagem de área ocupada pelas fibras colágenas tipos I e III¹⁶. Essa ferramenta é capaz de identificar e diferenciar a birrefringência das fibras colágenas, o que é relacionado à sua conformação morfológica. Assim, as fibras colágenas do tipo I apresentam birrefringência forte, emitindo brilho que varia do amarelo alaranjado ao vermelho, e as do tipo III emitem brilho de coloração esverdeada. O quantidade total das fibras colágenas foi obtida por meio da evidenciação simultânea no Image J das áreas ocupadas por fibras colágenas dos tipos I e III.

Para a imunomarcção com VEGF, cortes histológicos foram distendidos sobre lâminas carregadas (Starfrost, Knittel Glass, Alemanha). Após etapas de desparafinização e hidratação, os cortes foram submetidos a recuperação antigênica com solução de EDTA pH 9,0 em panela de pressão (Model S2800, Dako Cytomation California, Inc.). Em seguida, foram imersos em solução de bloqueio de peroxidase endógena (EP-11-20521 - Easy Path, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) por 10 minutos, lavados com água destilada e imersos em solução de bloqueio de proteínas de fundo (EP-12-20531 - Easy Path, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) por 10 minutos. As amostras foram incubadas por 18 horas com anticorpo primário anti-VEGF (sc-53462 - Santa Cruz Biotechnology, Inc.), na concentração de 1:100. Ato

contínuo, os cortes foram lavados duas vezes solução salina tamponada de fosfato (PBS), por cinco minutos, e incubados com anticorpo secundário e amplificador de reações N-Histofine® Simple Stain Rat MAX PO (MULTI) (Nichirei Biosciences Inc., Tóquio, Japão), por 30 minutos. As amostras foram submetidas a nova lavagem com PBS e, para a visualização da reação, incubadas em solução de diaminobenzidina por 5 minutos, e contracoradas com Hematoxilina de Mayer. A leitura das lâminas foi realizada através da análise da intensidade de imunomarcção, sendo atribuídos os escores um (discreto), dois (moderado) e três (acentuado).

Análise estatística

Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar anormalidade dos resíduos. Devido a não normalidade, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com 5% de significância, para comparar os tratamentos em cada momento, tanto na avaliação morfométrica macroscópica, quanto na análise dos parâmetros microscópicos ao exame histopatológico e imunoistoquímico. Foi realizado como pós-teste o teste t, com ajuste FDR. Nas análises de quantificação de colágeno, os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan. Para tal, utilizou-se o software R¹⁷ e o pacote R easyanova¹⁸.

RESULTADOS

Na padronização da ozonização da água, constatou-se por teste colorimétrico que a concentração do ozônio era reduzida em até 20% nos primeiros 10 minutos após a ozonização, reduzindo de 4,5 a 3,6 mcg/mL (Figura 3). Diante disso, um novo protocolo de ozonização foi realizado a cada três ratos tratados.

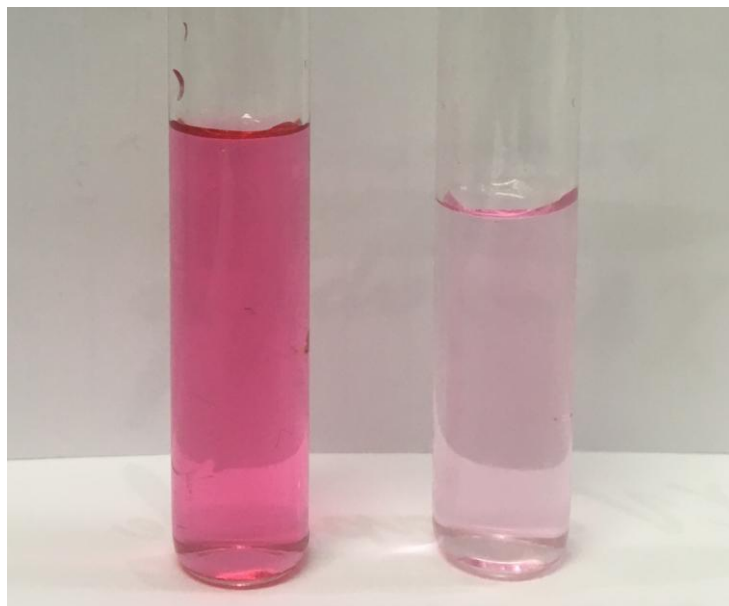


FIGURA 3 – Análise colorimétrica para mensuração de ozônio em água. No frasco à esquerda, amostra testada imediatamente após a ozonização da água. No frasco à direita, amostra testada 10 minutos após a ozonização. A intensidade da cor é proporcional à concentração de ozônio.

Na avaliação morfométrica macroscópica, a ferida dos animais do GA apresentou valores maiores de retração em relação àquela dos animais dos demais grupos (Figura 4), em todos os momentos de avaliação, a exceção do dia 22, em que todas as feridas estavam fechadas.

Em números absolutos, a retração da ferida dos animais do GA se sobressaiu àquela do GCL, e a do GO superou a do GAL, em todos os momentos avaliados (Tabela 1). A ferida cutânea nos ratos dos grupos GA e GCL apresentou retração significativamente maior ($p < 0,05$) em relação àquela dos animais dos grupos GO e GAL no dia três. No dia oito, a retração da ferida dos ratos do GA se manteve superior àquela dos grupos GO e GAL, que se igualaram estatisticamente à retração de ferida observada no GCL. A partir do dia 15, não houve diferença entre os grupos (Figura 5).

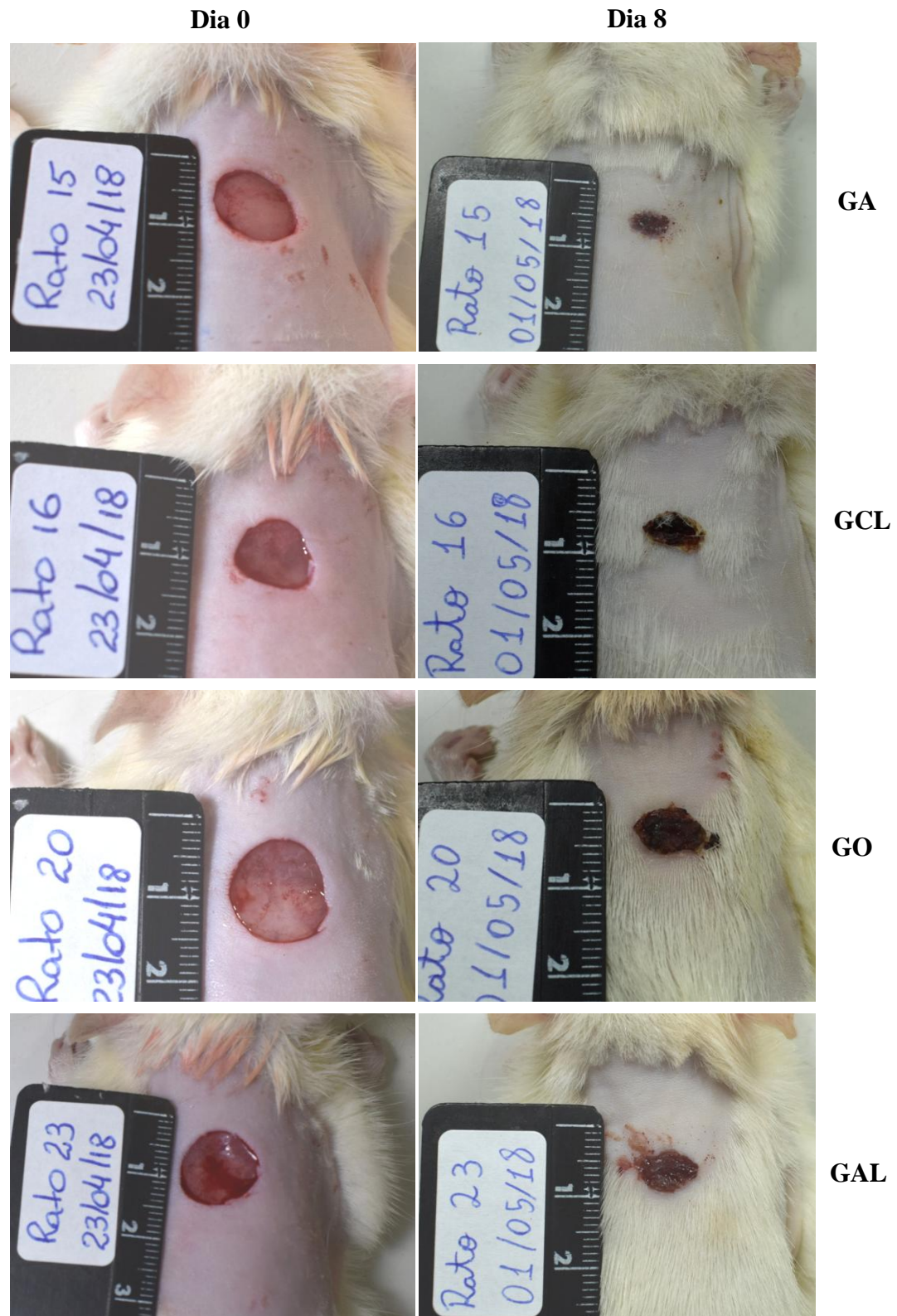


FIGURA 4 – Ferida no dorso dos ratos dos grupos água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL) aos dias zero (à esquerda) e oito (à direita) após a indução da lesão. Feridas de tamanho semelhante ao dia zero em todos os grupos e, aos oito dias após a indução da lesão, a ferida do rato do GA exibe maior retração em relação àquela dos ratos dos demais grupos.

TABELA 1 - Médias e medianas referentes ao percentual de retração da ferida cutânea em ratos submetidos a diferentes tratamentos aos momentos três, oito, 15 e 22 dias após o procedimento cirúrgico. GA = grupo água ozonizada; GCL = grupo cloreto de sódio; GO = grupo óleo ozonizado; GAL = grupo alantoína.

GRUPO	Tempo			
	3 DIAS	8 DIAS	15 DIAS	22 DIAS
GA	37,67 (37,96) ^a	84,91 (84,81) ^a	100 (100) ^a	100 (100) ^a
GCL	33,40 (33,17) ^a	78,16 (80,26) ^{ab}	99,58 (100) ^a	100 (100) ^a
GO	22,60 (24,41) ^b	69,84 (72,75) ^b	98,28 (100) ^a	100 (100) ^a
GAL	21,99 (22,65) ^b	62,42 (66,71) ^b	98,24 (100) ^a	100 (100) ^a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna são iguais ao Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

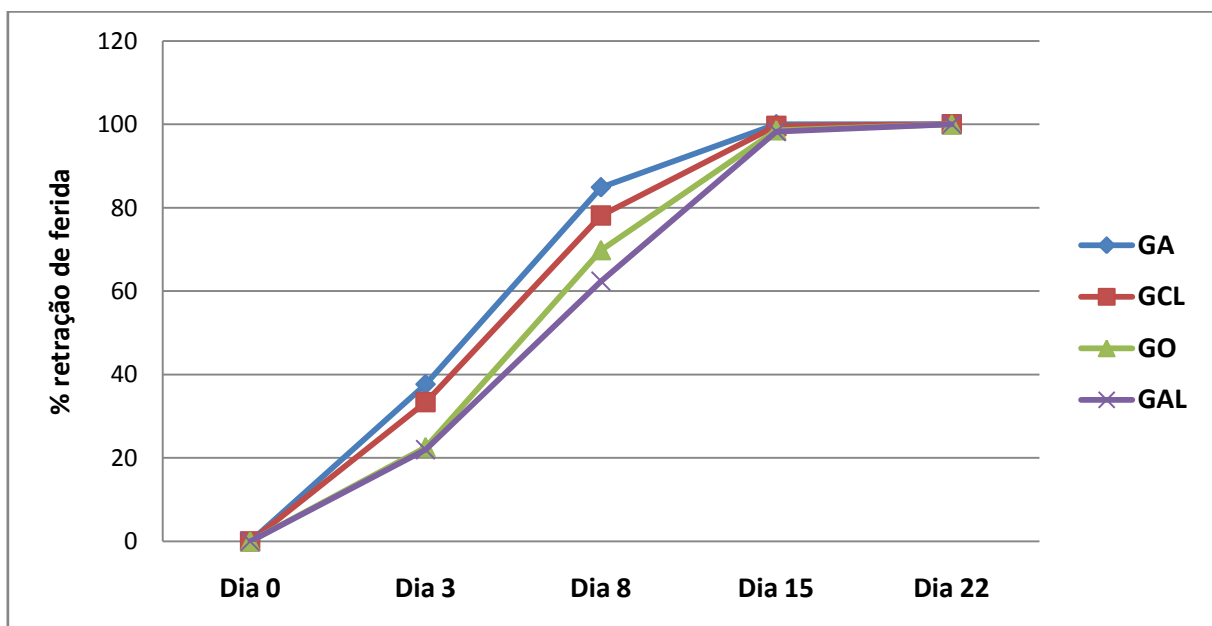


FIGURA 5 - Representação gráfica das médias do grau de retração (em porcentagem) das feridas dos grupos GA (água ozonizada), GCL (cloreto de sódio), GO (óleo ozonizado) e GAL (alantoína) em função do tempo.

Para as variáveis microscópicas infiltrado polimorfonuclear, infiltrado mononuclear, edema, tipo de MEC, reepitelização e acantose, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos dos grupos GA, GCL, GO e GAL (Tabela 2). Quanto à neovascularização, a ferida dos ratos do GO apresentou as maiores contagens de vasos sanguíneos em todos os momentos avaliados, enquanto o GCL apresentou as menores (Tabela 3). No dia três, a ferida dos animais do GO apresentavam-se significativamente mais vascularizada ($p < 0,05$) que a dos animais do GCL (Figura 6). Aos oito dias, as feridas dos grupos GO e GAL se sobressaíram ($p < 0,05$) a do grupo GCL, enquanto que aos 15 dias, a ferida dos ratos dos grupos GCL e GAL apresentou as menores contagens de vasos, o que gerou diferença entre estes e o GO (Figura 7). Já aos 22 dias, a ferida dos animais do grupo

GA apresentou a menor neovascularização ($p < 0,05$) em relação àquela dos ratos dos demais grupos.

TABELA 2 - Medianas das variáveis infiltrado polimorfonuclear, infiltrado mononuclear, edema, tipo de MEC, reepitelização e acantose na ferida cutânea dos ratos dos diferentes tratamentos e em função do tempo (três, oito, 15 e 22 dias após a indução da ferida). GA = grupo água ozonizada; GCL = grupo cloreto de sódio; GO = grupo óleo ozonizado; GAL = grupo alantoína.

PARÂMETRO	DIA	GA	GCL	GO	GAL
Infiltrado polimorfonuclear	3	3 ^a	3 ^a	3 ^a	2 ^a
	8	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a
	15	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	22	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Infiltrado mononuclear	3	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
	8	1 ^a	2 ^a	1 ^a	1 ^a
	15	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	22	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Edema	3	2 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a
	8	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	15	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	22	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Tipo de MEC	3	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
	8	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a
	15	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a
	22	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
Reepitelização	3	1 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	8	2 ^a	2 ^a	2 ^a	1 ^a
	15	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
	22	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
Acantose	3	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	8	0 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
	15	0 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
	22	0 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a

Escores: ausente (0), discreto (1), moderado (2), acentuado (3). Medianas seguidas de mesma letra na mesma linha são iguais ao Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

TABELA 3 – Medianas da neovascularização na ferida cutânea dos ratos aos dias três, oito, 15 e 22 após a indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).

GRUPO	Tempo			
	3 DIAS	8 DIAS	15 DIAS	22 DIAS
GA	9 ^{ab}	19 ^{ab}	10 ^{ab}	6 ^b
GCL	8 ^b	14 ^b	9 ^b	9 ^a
GO	11 ^a	20 ^a	13 ^a	9 ^a
GAL	10 ^{ab}	20 ^a	9 ^b	8 ^a

Valores seguidos de mesma letra na mesma coluna são iguais ao Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

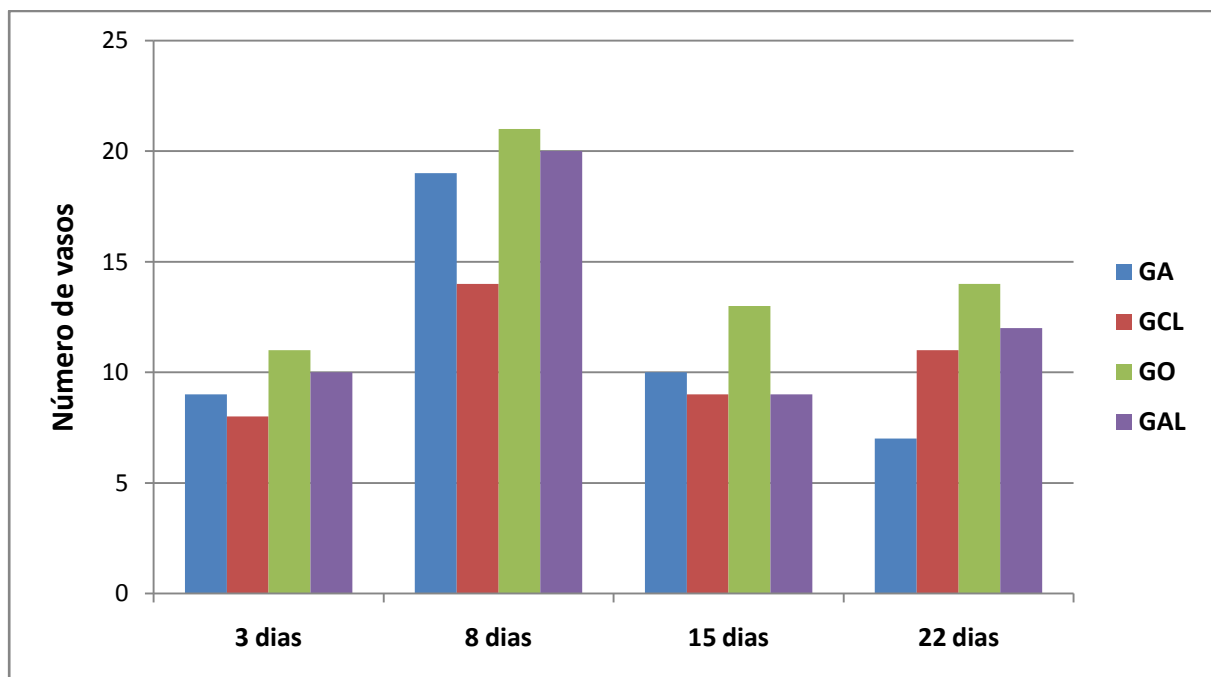


FIGURA 6 - Representação gráfica do número de vasos sanguíneos nos grupos GA (água ozonizada), GCL (cloreto de sódio), GO (óleo ozonizado) e GAL (alantoína) em função do tempo.

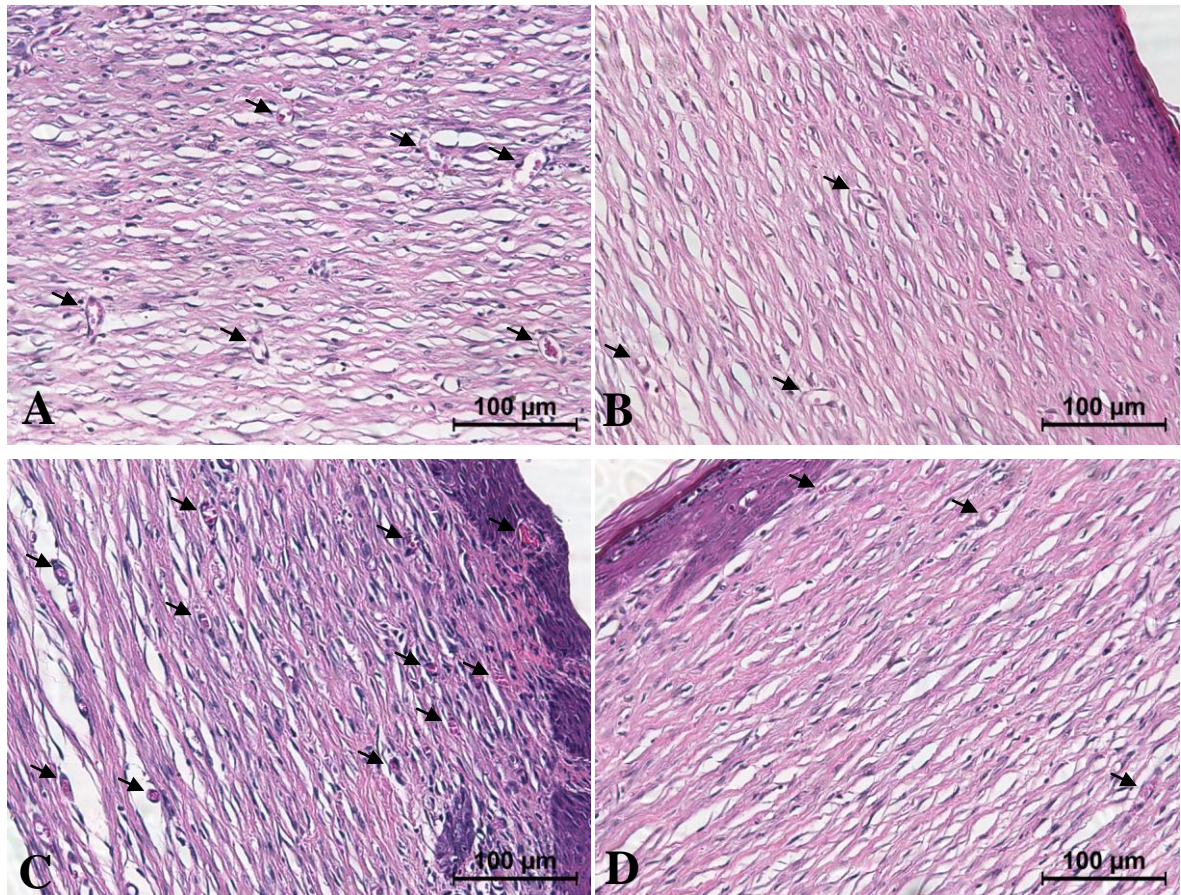


FIGURA 7 - Fotomicrografias da pele dos ratos dos grupos GA (A), GCL (B), GO (C) e GAL (D), respectivamente, ao 15º dia após a indução da ferida cutânea, mostrando os vasos neoformados (setas). A) Neovascularização moderada. B) e D) Neovascularização discreta. C) Neovascularização acentuada. HE.

Na análise microscópica com a coloração *picrosirius red* (Figura 8) ,à avaliação de oito dias, a ferida dos animais dos grupos GA e GCL apresentou fibras colágenas totais em maior número do que a ferida dos ratos do GAL ($p < 0,05$) (Tabela 4). Constatou-se ainda que a ferida dos animais dos grupos GCL e GA apresentou deposição marcadamente maior de colágeno tipo I que aquela dos ratos dos demais grupos no dia oito (Tabela 5), com diferença ($p < 0,05$) entre GA em relação a GAL, e entre GCL em relação aGO e GAL. Nos dias subsequentes,a análise do colágeno tipos I e III (Tabela 6) não apresentou diferença ($p > 0,05$).

TABELA 4 – Médias da quantidade total de fibras colágenas na ferida cutânea dos ratos aos dias oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).

GRUPO	Tempo		
	8 DIAS	15 DIAS	22 DIAS
GA	4,71 ^a	20,54 ^a	22,87 ^a
GCL	6,67 ^a	15,51 ^a	21,06 ^a
GO	3,66 ^{ab}	10,73 ^a	25,12 ^a
GAL	1,29 ^b	10,17 ^a	24,03 ^a

Valores seguidos de mesma letra na mesma coluna são iguais ao Teste de Duncan ($p < 0,05$).

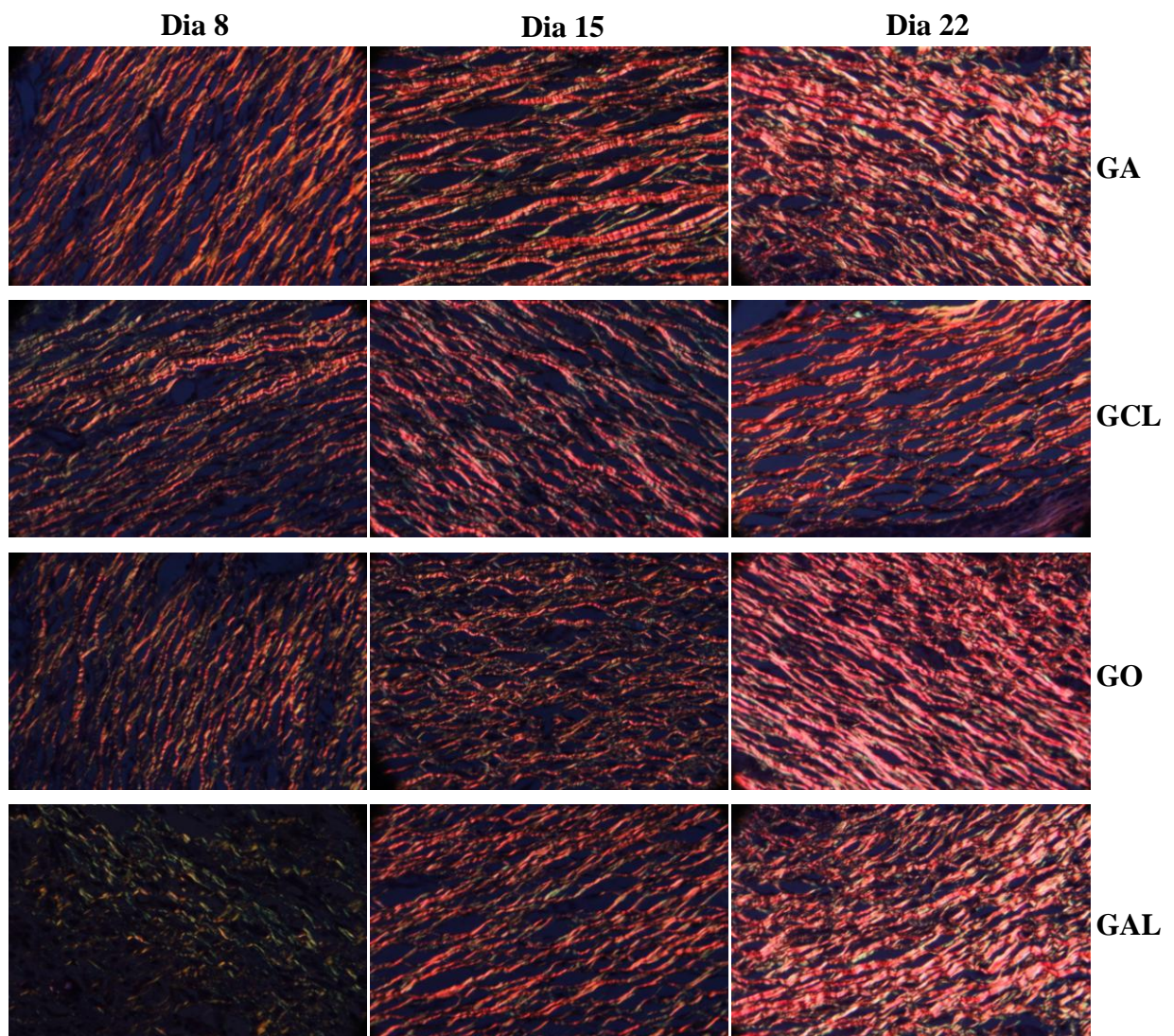


FIGURA 8 - Fotomicrografias da pele dos ratos mostrando fibras colágenas dos tipos I e III nos dias oito, 15 e 22 após a indução nos grupos tratados com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL). *Picrosirius red*, objetiva 40x.

TABELA 5 – Médias da quantidade de fibras colágenas do tipo I na ferida cutânea dos ratos aos dias oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).

GRUPO	Tempo		
	8 DIAS	15 DIAS	22 DIAS
GA	3,60 ^{ab}	19,28 ^a	19,23 ^a
GCL	5,06 ^a	14,00 ^a	18,18 ^a
GO	2,21 ^{bc}	9,09 ^a	22,64 ^a
GAL	0,65 ^c	8,51 ^a	20,46 ^a

Valores seguidos de mesma letra na mesma coluna são iguais ao Teste de Duncan ($p < 0,05$).

TABELA 6 – Médias da quantidade de fibras colágenas do tipo III na ferida cutânea dos ratos aos dias oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).

GRUPO	Tempo		
	8 DIAS	15 DIAS	22 DIAS
GA	1,11 ^a	1,25 ^a	3,64 ^a
GCL	1,60 ^a	1,50 ^a	2,88 ^a
GO	1,44 ^a	1,64 ^a	2,48 ^a
GAL	0,64 ^a	1,66 ^a	3,56 ^a

Valores seguidos de mesma letra na mesma coluna são iguais ao Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Ao avaliar percentualmente as fibras colágenas tipos I e III (Tabela 7) em relação ao colágeno total, notou-se que aos 15 dias a ferida dos ratos do GA apresentou maior quantidade ($p < 0,05$) de fibras colágenas maduras (tipo I) do que aquela dos animais do GAL. Aos 22 dias, a ferida dos ratos do GO apresentou valores superiores em relação àquela dos animais dos grupos GA e GAL. A Figura 9 ilustra graficamente a distribuição das fibras colágenas dos tipos I e III aos tempos analisados.

TABELA 7- Médias das porcentagens de fibras colágenas dos tipos I e III em relação ao colágeno total nas feridas cutâneas dos ratos aos dias oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).

GRUPO	Fibra colágena	Tempo		
		8 DIAS	15 DIAS	22 DIAS
GA	Tipo I	77,33 ^a	93,46 ^a	84,59 ^b
	Tipo III	22,67 ^A	6,54 ^B	15,41 ^A
GCL	Tipo I	75,93 ^a	88,83 ^{ab}	86,49 ^{ab}
	Tipo III	24,07 ^A	11,17 ^{AB}	13,51 ^{AB}
GO	Tipo I	50,10 ^a	84,60 ^{ab}	90,20 ^a
	Tipo III	49,90 ^A	15,40 ^{AB}	9,80 ^B
GAL	Tipo I	54,83 ^a	82,10 ^b	84,41 ^b
	Tipo III	45,17 ^A	17,90 ^A	15,59 ^A

Valores seguidos de mesma letra minúscula na mesma coluna e valores seguidos de mesma letra maiúscula na mesma coluna são iguais ao Teste de Duncan ($p < 0,05$).

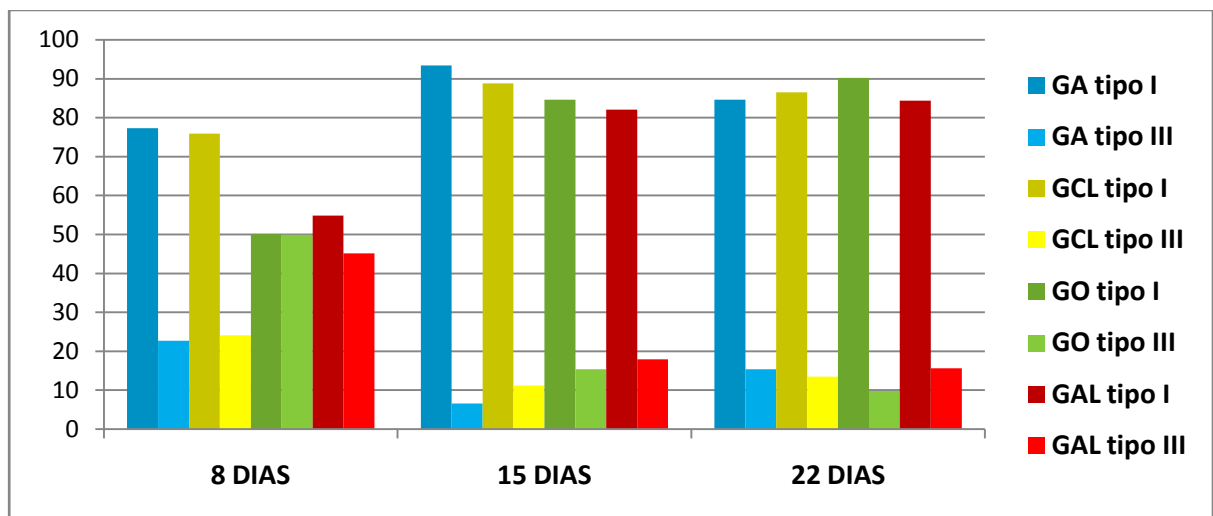


FIGURA 9 - Representação gráfica das porcentagens de colágeno tipos I e III nos grupos GA (água ozonizada), GCL (cloreto de sódio), GO (óleo ozonizado) e GAL (alantoína) em função do tempo.

Quanto à avaliação imunistoquímica do VEGF houve imunomarcção do endotélio vascular, de células inflamatórias, fibroblastos e, em alguns casos, células epiteliais (Figura 10). À análise estatística, a ferida dos ratos do GO apresentou maior imunomarcção de VEGF que aquela dos animais dos demais grupos (Tabela 8 e Figura 11). A ferida dos animais do GO apresentou maior imunomarcção de VEGF quando comparada àquela dos ratos do GCL aos dias oito e 22, e àquela dos animais do GA aos dias 15 e 22. Embora a

ferida dos ratos do GO tenha apresentado medianas maiores que aquela dos animais do GAL, não houve diferença entre esses grupos em todos os tempos avaliados.

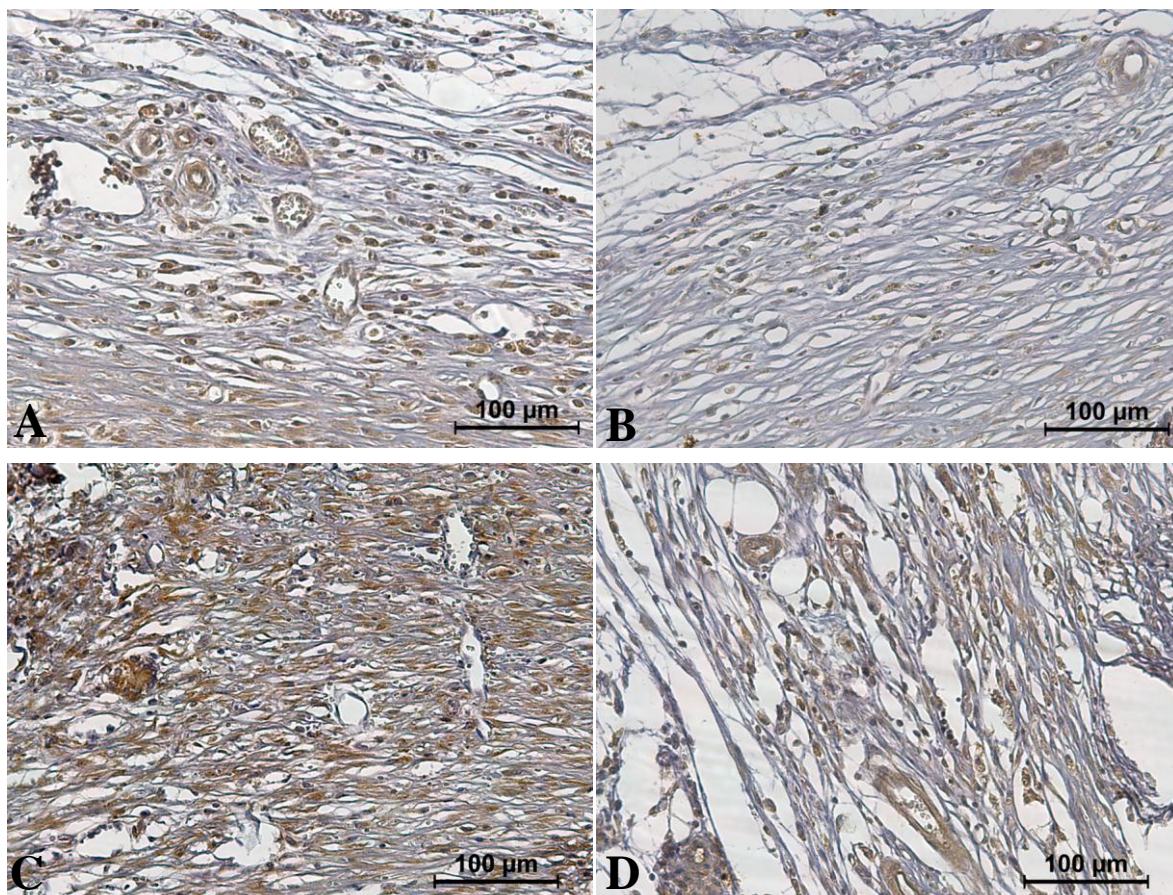


FIGURA 10 - Fotomicrografias da pele dos ratos dos grupos GA (A), GCL (B), GO (C) e GAL (D), respectivamente, ao 8º dia após indução da ferida cutânea. Imunomarcção acentuada do VEGF no grupo GO (C). IHQ, anti-VEGF.

TABELA 8 - Medianas da imunomarcção de VEGF na ferida cutânea dos ratos aos dias três, oito, 15 e 22 após indução e tratamento com água ozonizada (GA), cloreto de sódio (GCL), óleo ozonizado (GO) e alantoína (GAL).

GRUPO	Tempo			
	3 DIAS	8 DIAS	15 DIAS	22 DIAS
GA	1 ^a	3 ^{ab}	1 ^b	1 ^b
GCL	1 ^a	2 ^b	2 ^{ab}	0 ^b
GO	2 ^a	3 ^a	2 ^a	2 ^a
GAL	1 ^a	3 ^{ab}	2 ^{ab}	1 ^{ab}

Valores seguidos de mesma letra na mesma coluna são iguais ao Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

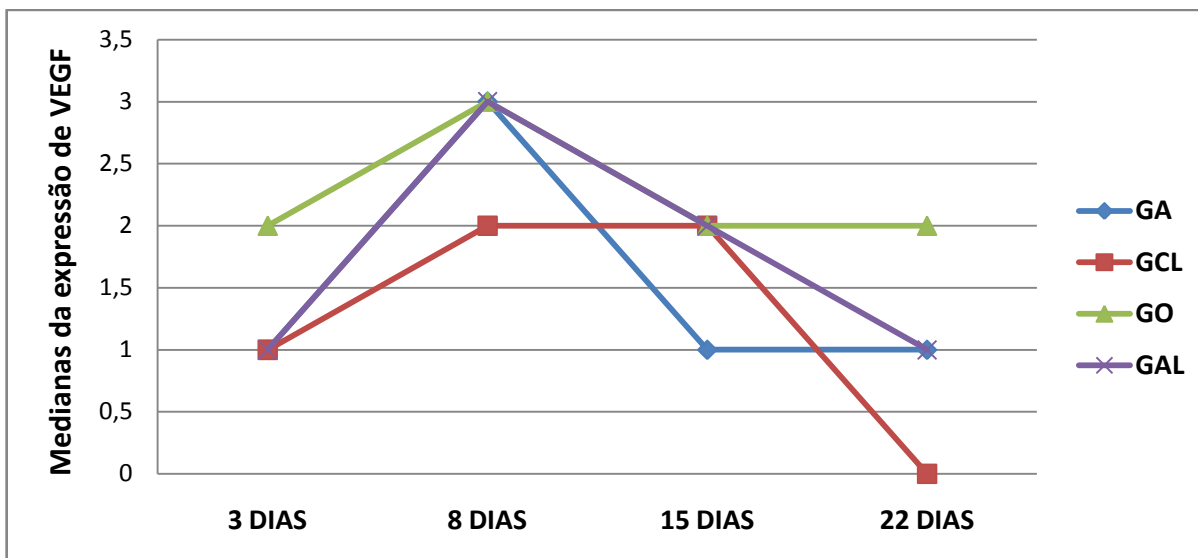


FIGURA 11 - Representação gráfica das medianas da imunomarcagem de VEGF na ferida cutânea dos ratos dos grupos GA (água ozonizada), GCL (cloreto de sódio), GO (óleo ozonizado) e GAL (alantoína) em função do tempo.

DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, em todos os tempos avaliados, a água ozonizada foi o tratamento que promoveu os maiores percentuais de retração das feridas cutâneas. As feridas do GA apresentaram maior retração do que aquelas dos grupos GO e GAL aos dias três e oito após a indução da ferida ($p < 0,05$), e melhores resultados numéricos em relação àquelas do GCL. De modo semelhante, Filippi¹⁹, ao tratar feridas na mucosa oral de humanos, evidenciou que a água ozonizada nas concentrações de 11 a 12 mcg/mL induziu maiores índices de retração da ferida nos sete primeiros dias de análise. Também foi demonstrado em outro estudo que a água ozonizada à concentração de 0,1 mcg/mL é capaz de acelerar o processo de regeneração em peixes-zebra submetidos a amputação da barbatana caudal²⁰. Esses resultados demonstram que a água ozonizada possui um amplo intervalo de dose com efeitos positivos sobre o reparo tecidual. Nesse sentido, a concentração de ozônio de 4,5 mcg/mL utilizada neste estudo e obtidas a partir do descrito por Bocci¹⁴, encontra-se no referido intervalo de efeitos benéficos e foi considerada eficiente no auxílio do reparo das feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos, o que corrobora as informações do citado autor quando refere que concentrações de 5 mcg/mL de ozônio na água são ideais para bem auxiliar as fases de proliferação e remodelamento de feridas cutâneas.

Ainda no que se refere a retração de ferida, embora não constatada diferença significativa quando comparados os tratamentos com água ozonizada e cloreto de sódio, é

biologicamente válido destacar que as feridas tratadas com água ozonizada não somente apresentaram maiores porcentagens de retração da ferida em todos os momentos analisados, mas também menores índices de acantose à análise microscópica. Nesse contexto, a ferida dos animais do GA apresentaram epiderme íntegra e uniforme enquanto que aquelas dos demais grupos exibiram algum grau de acantose até fases tardias de avaliação, o que histologicamente indica melhor organização do epitélio nas feridas tratadas com água ozonizada em relação às aquelas dos demais tratamentos²¹.

Pondera-se ainda que o menor desempenho da retração da ferida nos grupos tratados com óleo ozonizado e alantoína em relação ao tratado com cloreto de sódio (controle negativo), nos primeiros oito dias de tratamento, se justifique na textura dos tratamentos. Isso porque foi observado que a permanência de veículos mais densos, como o óleo e o creme sobre a pele e os pêlos adjacentes à ferida, induziram ao prolongamento e a maior intensidade do comportamento de auto higiene (*grooming*)²² dos animais desses grupos quando comparado às aqueles dos grupos GA e GCL, em que as feridas eram tratadas com soluções aquosas. Como consequência, é possível que a abrasão gerada tenha tornado o processo de retração de ferida ligeiramente mais lento, sem, contudo, interferir no processo de reparo como um todo, haja em vista que os grupos se igualaram estatisticamente aos 15 dias de tratamento.

Nesta pesquisa, as feridas que receberam óleo ozonizado com índice de peróxidos de 418,48 mEq/kg apresentaram, ao oitavo dia de tratamento, média de 69,84% de retração da ferida em relação ao seu tamanho original, valor abaixo daquele apresentado pelo GA. Enquanto isso, estudos^{23,24} demonstram que feridas tratadas com óleo ozonizado apresentaram maior retração nos primeiros dias de tratamento em comparação às aquelas que receberam apenas óleo, e o processo de retração estava completo a partir dos nove dias pós-lesão. Esses achados são endossados por estudos utilizando óleo ozonizado com concentrações de peróxido entre 700 e 1631 mEq/kg, que também relataram maior índice de retração da ferida^{9,25}. Em contrapartida, um desses estudos²⁵ evidenciou que o óleo a 500 mEq/kg de peróxidos não altera o índice de retração da ferida em comparação ao óleo puro e ao creme cicatrizante comercial, e outra⁹ pesquisa refere que a concentração de 3170 mEq/kg de peróxidos também não promove efeitos positivos sobre a retração da ferida. Nesse âmbito, pondera-se que a concentração de peróxidos do óleo utilizado nesta pesquisa, juntamente com a exarcebação do comportamento de *grooming* dos ratos devido a textura do óleo, justifiquem o desempenho do grupo GO aquém do esperado quanto ao aspecto da retração da ferida.

Ademais, há outra referência de feridas tratadas com óleo ozonizado que não apresentaram diferença na retração em comparação aos grupos controle. Contudo, a concentração de peróxido não foi informada²⁶. Dessa forma, considerando os resultados desta e de outras pesquisas infere-se que é de fundamental importância conhecer a concentração dos peróxidos no óleo para justificar possíveis efeitos benéficos ou a sua ausência. Isso porque, por princípio de ação do ozônio, um óleo com baixa concentração de peróxidos pode não produzir reações oxidativas suficientes para ativar vias bioquímicas orgânicas e desencadear os efeitos medicinais e, ao contrário, a alta concentração de peróxidos pode ultrapassar a capacidade metabólica do sistema antioxidante orgânico, limitando a ação benéfica do ozônio. Essa hipótese baseia-se em uma situação momentânea de estresse oxidativo, sem efeitos deletérios, mas suficiente para ativar respostas terapêuticas no organismo, o que é tido como princípio da ozonioterapia¹⁴. Portanto, considerando a concentração de peróxidos no óleo ozonizado, falta padronização quanto ao intervalo de concentração ideal para a obtenção dos efeitos benéficos em cada fase da cicatrização da ferida.

Quanto à análise do tipo de MEC, levou-se em consideração a evolução do processo cicatricial em função da fase proliferativa e da fase de maturação e remodelamento. Para isso, foram observados os aspectos celulares (migração, proliferação e diferenciação dos fibroblastos), intersticiais (quantidade e morfologia de proteínas da MEC) e vasculares (aumento da vascularização na fase proliferativa, e decréscimo na fase de maturação e remodelamento). Para esta variável, todos os grupos testados apresentaram resultados semelhantes em todos os tempos analisados. Contudo, ressalta-se que os tratamentos utilizando soluções ozonizadas podem ajudar na evolução do reparo tecidual, ajudando em alguns dos aspectos analisados. Por exemplo, foi observado em um ensaio *in vitro* acentuada migração fibroblástica sob a ação de solução salina com concentração de ozônio a 8 mcg/mL²⁷. Embora a análise da população de fibroblastos nos grupos GA, GCL, GO e GAL não tenha demonstrado diferenças marcantes, a maior contração da ferida nos ratos do GA leva a crer que, de alguma forma, a água ozonizada agiu mais nesse tipo celular, uma vez que a contração da ferida está diretamente relacionada a ação de fibroblastos ativados e diferenciados a miofibroblastos.

Semelhante aos resultados do presente estudo quanto a proliferação fibroblástica e deposição da MEC, outra pesquisa também não relatou diferença entre os tratamentos com óleo ozonizado e controle²⁶. De outra parte, um estudo²³ aponta que o óleo ozonizado aumenta o processo de migração de fibroblastos e potencializa sua ativação de forma crescente durante os cinco primeiros dias após a lesão, o que corrobora os resultados de Kim

*et al.*²⁴, que encontraram mais fibroblastos e fibras colágenas à coloração de tricrômio de Masson sete dias após a indução da ferida; assim como os de Pai *et al.*²⁵, que identificaram maior força tênsil em feridas tratadas com óleo ozonizado, atribuindo a isso os maiores níveis de colagenização observados nessas feridas.

Nesse sentido, a análise à coloração de *picrosirius red* demonstrou que as feridas dos grupos GA e GO exibiram maior deposição de colágeno total aos 15 e 22 dias, respectivamente. Ao analisar o tipo de colágeno envolvido, as feridas desses mesmos grupos apresentavam colágeno tipo I (maduro) em maior quantidade nesses dias. Ainda, as feridas do GA aos oito dias e as do GO aos 22 dias apresentaram diferença em relação aos demais grupos quanto à porcentagem de colágeno tipo I na ferida, apontando que essas não somente produziram maiores quantidades de colágeno, mas também as maiores quantidades de colágeno do tipo I, quando comparadas àquelas dos demais grupos.

Para explicar o bom desempenho em relação à população de fibroblastos e de deposição de MEC dos tratamentos com ozônio, considera-se o aumento de fatores de crescimento em tecidos expostos a esta molécula²⁴, como o PDGF, que promove a migração e proliferação de fibroblastos e a diferenciação destes em miofibroblastos; e do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), também promotor da proliferação de fibroblastos e produção de matriz extracelular^{2,28-30}. É importante ressaltar que a dose de ozônio fornecido, seja por água ou óleo ozonizados, interfere na quantidade de componentes bioquímicos, podendo gerar efeitos positivo, placebo ou até mesmo nocivo.

Quanto às variáveis infiltrado inflamatório e reepitelização não houve diferença entre os grupos nos momentos analisados. No entanto, as feridas dos grupos GA, GO e GAL, aos oito dias, apresentaram menor infiltrado inflamatório mononuclear em comparação àquelas do GCL. Sobre isso, sabe-se que a exposição ao ozônio modula a resposta inflamatória, reduzindo a infiltração de leucócitos²⁰. Esse efeito anti-inflamatório pode ser explicado pelo aumento na liberação de TGF- β que, dentre suas funções, reduz a quimiotaxia das células de defesa, limitando a fase inflamatória e induzindo a proliferativa, sendo ainda responsável pela proliferação fibroblástica e produção de matriz extracelular^{2,28-30}. Resultados semelhantes são apresentados por Pai *et al.*²⁵, que referem melhor reepitelização, traduzida por melhor organização do epitélio, e efeito imunomodulador, traduzido pela menor intensidade de células inflamatórias em feridas tratadas com óleo ozonizado em elevada concentração de peróxidos, em comparação àquelas tratadas com óleo puro.

Sobre a neovascularização, chama a atenção que as feridas do GO apresentaram, em todos os momentos avaliados, maior contagem de vasos sanguíneos em relação às feridas

dos demais grupos. Esse achado foi mais pronunciado aos dias três e oito, momento em que o GO apresentou média de neovascularização maior ($p < 0,05$) em comparação àquela do GCL; e aos 15 dias, em que as feridas desse grupo exibiram mais neovasos que aquelas de GCL e GAL. Aos 22 dias, os grupos GCL, GO e GAL apresentavam contagens maiores ($p < 0,05$) que o GA. Da mesma forma, Valacchiet *al*⁹ observaram maior índice de angiogênese aos três dias pós-indução da ferida em grupos tratados com óleo ozonizado com concentração de peróxido de 949 a 3170 mEq/kg. No entanto, o maior grau de neovascularização foi mantido no grupo tratado com óleo contendo 1631 mEq/kg de peróxido, aos sete e 14 dias pós-indução das feridas, e no grupo tratado com 3170 mEq/kg, no 14º dia. Diante disso, ao inferir que a concentração de peróxido no óleo utilizado neste estudo (418,48 mEq/kg) teve impacto positivo sobre o aumento da neovascularização nas feridas em comparação aos demais tratamentos, já que as feridas do GO apresentaram maior contagem de vasos neoformados em todos os tempos analisados, demonstra-se que o intervalo terapêutico do óleo ozonizado é ainda maior do que a literatura cita. Além disso, o grupo GA se apresentou estatisticamente igual ao tratamento com óleo ozonizado nos dias três, oito e 15, com exceção do dia 22, em que ele apresentava quantidade significativamente menor ($p < 0,05$) que os outros grupos. Considerando que neste momento do reparo tecidual já há remodelamento do tecido cicatricial, esse grupo se mostrou mais avançado na fase de maturação e remodelamento que os outros grupos.

A exemplo do que ocorre com outros fatores de crescimento, a ozonioterapia induz maior liberação daqueles que atuam sobre a neovascularização²⁴, como o PDGF e o TGF- β , que estimulam a produção de VEGF, responsável por promover a migração e proliferação de células endoteliais, além de vasodilatação^{2,28-30}. A análise imunoistoquímica do VEGF realizada neste estudo corrobora essas informações, já que as feridas do GO exibiram maior intensidade desse fator de crescimento em todos os dias analisados. Um modelo experimental³¹ utilizando óleo ozonizado evidenciou que a aplicação dessa terapia em *flaps* cutâneos melhorou a neovascularização das feridas em relação ao grupo tratado com óleo e ao grupo sem tratamento, também pela maior imunomarcagem de VEGF nos animais expostos ao óleo ozonizado. Ademais, a aplicação de ozônio em outros veículos pode promover esse efeito, a exemplo do ozônio gasoso³² em feridas induzidas na gengiva de porcos, sobretudo na fase inicial do reparo. No referido estudo, a imunomarcagem de VEGF ocorreu nas células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos na área da lesão, tal como ocorrera nesta pesquisa.

A ozonioterapia apresenta grande potencial no contexto do reparo de feridas cutâneas. No entanto, a técnica se mantém controversa quanto à sua confiabilidade entre profissionais da saúde. Nesse sentido, constata-se a necessidade de estabelecer critérios científicos quanto ao tratamento de feridas com água ozonizada. Ao mesmo tempo, os resultados deste estudo trazem relevante contribuição científica quanto a ação biológica benéfica da ozonioterapia. Exemplo disso é a constatação de que embora haja descrição de que a meia vida do ozônio em água é de nove horas à temperatura ambiente⁸, a depleção do ozônio na água ocorreu de forma muito mais rápida, em questão de minutos. Assim, é possível que tratamentos com água ozonizada armazenada reflitam resultados inconsistentes devido a variação na concentração do gás ozônio presente na água, o que pode levar ao descrédito da técnica. Portanto, pesquisas envolvendo ozonioterapia devem ser rigorosamente controladas quanto a via de administração, ao veículo e a concentração do ozônio.

CONCLUSÕES

A água e o óleo ozonizados nas concentrações testadas favorecem o processo de reparo tecidual em feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos. A água ozonizada na concentração de 4,5 mcg/mL potencializa a retração da ferida, promove melhor organização do epitélio e acelera a entrada da cicatrização na fase de maturação e remodelamento, enquanto o óleo ozonizado à concentração de 418,48 mEq/kg de peróxidos promove maior neovascularização durante o reparo tecidual e maior deposição de colágeno do tipo I a partir da terceira semana de tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Aydin H, Tatar C, Savas OA, Karsidag T, Ozer B, Dursun N, Bekem A, Unal A, Tuzun IS. The Effects of Local and Systemic Administration of Proline on Wound Healing in Rats. *J Invest Surg.* 2018; 1-7.
2. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012; 49(1):35–43.
3. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol.* 2018; 56:235-241
4. Pereira ÂL, Bachion MM. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. *Rev Bras Enferm.* 2005; 58(2):208–213.
5. Mahmoud A, Freire RS. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. *QuímNova.* 2007; 30(1):198–205.
6. Haddad MA, Souza MV, Hincapie JJ, Ribeiro Junior JI, Ribeiro Filho JD, Benjamin LA. Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à

- ozonioterapia. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009; 61(3):539-546.
7. Yucesoy T, Kutuk N, Canpolat DG, Alkan A. Comparison of Ozone and Photo-Biomodulation Therapies on Mental Nerve Injury in Rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 75(11):2323-2332.
 8. Bocci V, Di Paolo N. Oxygen-Ozone Therapy in Medicine : An Update. *Blood Purif.* 2009; 28(4):373–376.
 9. Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V, Travagli V. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair Regen.* 2011; 19(1):107-115.
 10. Sunil VR, Patel-Vayas K, Shen J, Laskin JD, Laskin DL. Classical and alternative macrophage activation in the lung following ozone-induced oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 263(2):195–202.
 11. Araneda S, Commin L, Atlagich M, Kitahama K, Parraguez VH, Pequignot JM, Dalmaz Y. VEGF overexpression in the astroglial cells of rat brainstem following ozone exposure. *Neurotoxicology.* 2008; 29(6):920–927.
 12. Wei A, Feng H, Jia XM, Tang H, Liao YY, Li BR. Ozone therapy ameliorates inflammation and endometrial injury in rats with pelvic inflammatory disease. *Biomed Pharmacother.* 2018; 107:1418-1425.
 13. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espin M, Duprè I, Pinna A, Mollicotti P, Fadda G, Zanetti S. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). *J Appl Microbiol.* 2011; 90(2):279–284.
 14. Bocci V. *Ozone: a new medical drug.* Netherlands: Springer, 2005.
 15. Uzêda-E-Silva VD, Rodriguez TT, Rocha IA, Xavier FC, Dos Santos JN, Cury PR, Ramalho LM. Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(7):1363-1370.
 16. Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MC, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, De Avó LR, Araújo-Moreira FM, Parizotto NA. Comparative Effects of Two Different Doses of Low-Level Laser Therapy on Wound Healing Third-Degree Burns in Rats. *Microsc Res Tech.* 2016; 79(4):313–320.
 17. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Acessado em 13 de outubro de 2018
 18. Arnhold E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2013; 50(6):488-492.
 19. Filippi A. The influence of ozonised water on the epithelial wound healing process in the oral cavity. *Dtsch Zahnarztl.* 2001; 56.
 20. Hao K, Li Y, Feng J, Zhang W, Zhang Y, Ma N, Zeng Q, Pang H, Wang C, Xiao L, He X. Ozone promotes regeneration by regulating the inflammatory response in zebrafish. *Int Immunopharmacol.* 2015; 28(1):369-375
 21. Ackermann MR. Inflammation and Healing. In: Zachary JF, editor. *Pathologic basis of veterinary disease.* 6th ed. Saint Louis: Elsevier; 2017. p.73–131.
 22. Rojas-Carvajal M, Fornaguera J, Mora-Gallegos A, Brenes JC. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour

- in rats. *Anim Behav.* 2018; 137:1-11.
23. Xiao W, Tang H, Wu M, Liao Y, Li K, Li L, Xu X. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biosci Rep.* 2017; 37(6):9
 24. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J. Korean Med. Sci.* 2009; 24(3):368–374.
 25. Pai SA, Gagangras SA, Kulkarni SS, Majumdar AS. Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. *Indian J Pharm Sci.* 2014; 76(1):87-92.
 26. Sakazaki F, Kataoka H, Okuno T, Ueno H, Semma M, Ichikawa A, Nakamuro K. Ozonated Olive Oil Enhances the Growth of Granulation Tissue in a Mouse Model of Pressure Ulcer. *Ozone: Scien& Eng.* 2007; 29(6):503-507.
 27. Borges GÁ, Elias ST, Silva SM, Magalhães PO, Macedo SB, Ribeiro AP, Guerra EN. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2017; 45(3):364–370.
 28. Abbas AK, Lichtmann AH. Inflamação e reparo. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins Patologia Básica.* 9th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p. 29–73
 29. Kwan PO, Tredget EE. Biological Principles of Scar and Contracture. *Hand Clin.* 2017; 33(2):277-292.
 30. DiPietro LA. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Curr Opin Rheumatol.* 2013; 25(1):87-91.
 31. Krkl C, Yigit MV, Ozercan IH, Aygen E, Gulturk B, Artas G. The Effect of Ozonated Olive Oil on Neovascularization in an Experimental Skin Flap Model. *Adv Skin Wound Care.* 2016; 29(7):322-327.
 32. Eroglu ZT, Kurtis B, Altug HA, Sahin S, Tuter G, Baris E. Effect of topical ozonotherapy on gingival wound healing in pigs: histological and immunohistochemical analysis. *J Appl Oral Sci.* 2019; 27:1-11.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ozonioterapia tem sido pesquisada há tempo em diferentes áreas. No que concerne às feridas cutâneas, essa técnica tem sido mais aceita e bem recebida, sendo amplos os relatos quanto a sua eficiência. Inclusive, muitos mecanismos envolvidos na interação do ozônio com os tecidos estão descritos, assim como a dinâmica de sua atuação na cicatrização de feridas. No entanto, ainda há grande empirismo quando se trata de estabelecer protocolos terapêuticos, não havendo padronização de doses, tempo de exposição e frequência das aplicações do ozônio, seja na forma de água ou óleo ozonizados. Isso acaba por gerar discrepâncias nos resultados de diferentes trabalhos, o que demonstra que as possibilidades de pesquisa nessa área ainda não esgotaram.

Quanto ao que pudemos analisar, a utilização da água ozonizada produziu efeitos positivos sobre a retração da ferida, que ocorreu de forma mais rápida. Ainda que o grupo GCL tenha obtido resultado matematicamente semelhante, as médias de retração das feridas tratadas com a água ozonizada se mantiveram mais altas em todos os momentos e, além disso, na avaliação microscópica a ferida dos animais dos demais grupos apresentou maior acantose, o que leva a crer que a reepitelização no grupo GA ocorreu de forma mais eficiente e organizada. Além disso, mostrou maior quantidade de fibras colágenas aos 15 dias, inclusive com quantidades consideráveis de colágeno do tipo I.

Já o óleo ozonizado promoveu efeito positivo sobre a neovascularização, apresentando diferença dos demais grupos em todos os dias avaliados. A marcação de VEGF nesse grupo foi também a maior em todos os momentos de avaliação, com diferença estatística a partir do dia oito. Isso mostra que o tratamento modula positivamente a neovascularização desde as fases iniciais, o que pode variar devido a concentração de peróxidos no óleo adquirido, tendo em vista que trabalhos com diferentes níveis de peróxido apresentaram resultados variáveis em diferentes momentos do reparo.

No entanto, é necessário ressaltar que as metodologias entre os artigos publicados diferem muito: os controles negativos e positivos e até mesmo o tipo de óleo ou líquidos ozonizados (e suas respectivas concentrações de ozônio) escolhidos dificultam traçar comparações entre os estudos. Porém, a unanimidade em alguns pontos reitera o potencial terapêutico do ozônio, restando a padronização das técnicas para consagrá-lo na clínica dermatológica como uma terapia efetiva ao tratamento das feridas cutâneas.

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 10 de julho de 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 079/17

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 29/06/2017
- Título do projeto:** Efeito da água e do óleo ozonizados no reparo tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos
- Pesquisador Coordenador no SAP:** Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Rafael Cavalcante Sanguanini
- Pesquisadores Participantes:** Não há
- Médico Veterinário/CRMV:** Rafael Cavalcante Sanguanini/ CRMV 7671
- Unidade onde será realizado:** Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivo geral: Avaliar os efeitos da aplicação tópica de soluções ozonizadas na reparação tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos.

Objetivos específicos: Avaliar quanto ao efeito da água ozonizada sobre a reparação tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos.

Avaliar quanto ao efeito do óleo ozonizado sobre a reparação tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos.

Comparar o efeito da água ozonizada, do óleo ozonizado e aqueles dos grupos controle positivo (terapia cicatrizante tópica convencional – creme de alantoína a 0,2%) e negativo (cloreto de sódio a 0,9%) sobre feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Acompanhar macroscopicamente e microscopicamente a reparação tecidual das feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos.

Justificativa: Averiguar a eficácia da cicatrização de feridas tratadas com soluções ozonizadas, em contraste com grupos controle positivo e negativo, afim de pesquisar se este tratamento, que possui vantagens tais como baixo custo, fácil aplicação, ausência de efeitos adversos e não indução de resistência bacteriana, é uma boa opção nos tratamentos de feridas cutâneas.

IV - Sumário do projeto:

- ❑ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**
A possibilidade de conhecer e comparar os efeitos dos tratamentos a serem utilizados no reparo tecidual de feridas cutâneas só é possível com modelos in vivo.
- ❑ **Prevê Projeto Piloto:** Não
- ❑ **Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** 48 ratos Wistar distribuídos em quatro grupos com 12 animais cada, sendo Grupo água (GA), Grupo óleo (GO), Grupo alantoína (GAI), Grupo cloreto (GCI).
- ❑ **Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** 48 ratos Wistar machos com 275g.
- ❑ **Fonte de obtenção do animal:** Biotério Central ICB-UFV
- ❑ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os animais serão mantidos na Unidade de Experimentação Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, à temperatura média de 25°C, com umidade relativa do ar de aproximadamente 60%, em ambiente com ventilação (que não incide diretamente sobre os animais) e ciclo de iluminação de 12 horas claro/12 horas escuro. Os animais serão distribuídos 3 a 3, em caixa para ratos, medindo 41,4 cm de comprimento x 34,4 cm de largura x 16,8 cm de altura. Será fornecida água e ração comercial própria para a espécie, à vontade, e maravalha autoclavada como cama. Como enriquecimento ambiental serão confeccionadas tocas e materiais para os animais roerem (bloquinhos de madeira).
- ❑ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não serão utilizados agentes infecciosos. Como riscos os pesquisadores apontam mordedura por parte dos animais. Para evitar isso, todos os envolvidos na manipulação dos animais passarão por treinamento prévio com o manejo desses animais.
- ❑ **Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Os animais, após período de adaptação, passarão por procedimento de indução de feridas cutâneas utilizando protocolo de anestesia inalatória (isoflurano) e protocolo de analgesia com fármaco opióide cloridrato de tramadol, por três dias no pósoperatório. Os animais serão divididos em quatro grupos para tratamento (Grupo água ozonizada, Grupo óleo ozonizado, Grupo alantoína e Grupo cloreto), que serão realizados diariamente, uma vez ao dia. Antes da aplicação dos tratamentos, os animais, já contidos, passarão por procedimento de planimetria (que consiste em posicionar um filme transparente sobre a ferida e demarcar a área com caneta) para acompanhamento macroscópico da

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



cicatrização. Para análise microscópica, três animais de cada grupo serão submetidos a eutanásia nos momentos três, oito, 15 e 22 dias após a indução das feridas, e uma amostra de pele contendo tecido cicatricial será encaminhada para análise histopatológica. O descarte de carcaças será feito por incineração.

- ❑ **Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** Os animais serão observados diariamente por período aproximado de 5 minutos (no mínimo) para determinação de comportamentos ou sinais de dor, tais como piloereção, cifose vertebral, diminuição do comportamento exploratório, diminuição do consumo de água e/ou alimento, auto-mutilação, vocalização a palpação da área com a ferida (dorso), agressividade, entre outros. Caso constatado, o protocolo de analgesia e manejo serão revisados.

- ❑ **Grau de invasividade:** GI 2
- ❑ **Material utilizado em outros projetos:** Não
- ❑ **Método de eutanásia:** Sobredose de isoflurano
- ❑ **Destino do animal:** Após o procedimento de eutanásia, os animais serão colocados em sacos plásticos e levadas até a câmara fria do Setor de Patologia Animal da EVZ-UFG. A incineração dos cadáveres ocorrerá de acordo com o cronograma estabelecido no Setor de Patologia Animal.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ❑ **Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG:** Os pesquisadores apresentaram todos os documentos necessários.
- ❑ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Os pesquisadores apresentaram de forma clara e objetiva todos os detalhes de manejo e cuidado com os animais durante o período experimental.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31 de agosto de 2019**.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



VII - Data da reunião: 10/07/2017.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Pacheco Miguel'.

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com