

**UNIVERSIDADE BRASIL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS ITAQUERA**

TÂNIA MARIA QUINTAL MUNIZ

**APLICAÇÃO SUBCUTÂNEA DA OZONIOTERAPIA NO PROCESSO
DE REPARAÇÃO TECIDUAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

São Paulo – SP
2023

CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TÂNIA MARIA QUINTAL MUNIZ

**APLICAÇÃO SUBCUTÂNEA DA OZONIOTERAPIA NO PROCESSO
DE REPARAÇÃO TECIDUAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Prof(a). Dr(a). Lívia Assis Garcia
Orientadora

São Paulo – SP
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M936a MUNIZ, Tânia Maria Quintal.

Aplicação subcutânea da Ozonioterapia no processo de reparação tecidual em modelo experimental de feridas cutâneas em ratos / Tânia Maria Quintal Muniz -- São Paulo: Universidade Brasil, 2023.
46 f. il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso de Medicina Veterinária da Universidade Brasil.
Orientação: Profa. Dra. Lívia Assis Garcia.

1. Feridas cutâneas. 2. Reparo tecidual. 3. Ozonioterapia. 4. Reabilitação. I. Garcia, Lívia Assis. II. Título.

CDD 617.1406

TERMO DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico esse Trabalho de Conclusão de Curso ao meu pai Antônio Reinaldo (*in memoriam*), que infelizmente não teve o prazer em me ver formar, mas sei que onde quer que ele esteja, está vibrando por mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e por me dar forças para ultrapassar todas as dificuldades encontradas ao longo do curso.

Agradeço aos meus pais Antônio (*in memoriam*) e Edeilsa por sempre estarem ao meu lado, apoiando e fazendo de tudo para eu chegar até aqui. Obrigada por serem minha maior inspiração, me derem força para continuar e nunca desistir. Amo vocês!

Agradeço ao meu esposo Anderson, pelo incentivo, paciência e companheirismo durante toda trajetória. Obrigada por sempre acreditar em mim e nos meus sonhos.

Às minhas irmãs, tios e amigos que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

À minha amiga Daniela, que me recebeu de braços abertos no primeiro dia de aula, e sempre esteve presente na minha vida acadêmica, se tornando uma pessoa essencial para que eu concluísse essa fase, dividindo alegrias, medo de provas, risadas, discutindo casos e condutas referentes a pacientes.

Agradeço à minha orientadora Livia Assis, por ceder o seu tempo, pela paciência e dedicação durante o projeto, pela confiança em meu trabalho, por me ensinar e pela compreensão. Seus conhecimentos foram cruciais para o resultado final do trabalho.

A todos os professores da universidade, que sempre mostraram comprometimento e por se importarem em sempre nos entregar o melhor durante o curso, em nos passar conhecimento de forma didática e inspirando de forma profissional e pessoal, sempre nos trazendo lições que muitas vezes iam além da sala de aula.

Agradeço a toda equipe do Hovet Animale, por terem me dado a oportunidade de passar toda minha graduação e principalmente o estágio obrigatório, onde aprendi e desenvolvi os conhecimentos técnicos da medicina veterinária e por acreditarem no meu potencial.

E por fim, agradeço a todas as pessoas, que aqui não foram previamente citadas, mas que de alguma forma passaram por minha vida durante esse período e contribuíram para que eu pudesse concluir essa fase tão importante da minha vida.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

Feridas cutâneas são definidas por uma descontinuidade na pele favorecendo o contágio e contaminação por micro-organismos, o que dificulta o processo de reparo tecidual, tornando-se assim um impacto considerável na saúde pública. A ozonioterapia tem sido frequentemente utilizada como estratégia terapêutica, segura e efetiva que visa eliminar micro-organismos, modular a resposta inflamatória e estimular a reparação tecidual em diversas alterações de pele. Contudo, os parâmetros de aplicação da ozonioterapia sobre o tecido epitelial durante feridas cutâneas permanece incerta. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da aplicação subcutânea da ozonioterapia o reparo tecidual em modelo de feridas cutâneas em ratos. Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, divididos em 2 grupos: Grupo controle (GC) e grupo ferida e tratamento com ozonioterapia (GO). Para ozonioterapia foi administrado, via subcutânea 12 mg/ml do concentrado de ozonioterapia em 2 pontos na borda da lesão (cranial e caudal) por um período de 4 dias consecutivos. Para avaliação de resultados e comparação dos efeitos do tratamento foram realizadas análises histológicas e morfométrica das feridas. Os resultados mostraram que no grupo OZ houve um aumento no índice de cicatrização da ferida (ICF), melhora nos aspectos morfológicos de reparo e não houve diferença na área do tecido semelhante a derme e na análise macroscópica. Assim, pode-se concluir que o protocolo de tratamento de ozonioterapia utilizado no presente estudo promoveu um efeito positivo no processo de reparação tecidual em feridas cutâneas, entretanto, faz-se necessários estudos adicionais com objetivo de elucidar os mecanismos de ação que envolve o uso da terapia no reparo de feridas cutâneas. Ademais, com a intenção de elucidar o uso da ozonioterapia na prática clínica da medicina veterinária, apresentamos um estudo de caso envolvendo o uso da técnica no reparo de feridas cutâneas com resultados promissores.

Palavras-chave: Feridas cutâneas. Reparo tecidual. Ozonioterapia. Reabilitação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resultados da análise macroscópica da úlcera.....	25
Figura 2 – Resultados da análise referente ao ICF	26
Figura 3 – Fotomicrografias representativas da análise histológica	27
Figura 4 – Gráfico representativo dos resultados da análise do tecido semelhante A derme.....	27
Figura 5 – Lesão em membro torácico esquerdo de um felino, macho, SRD	33
Figura 6 – Membro torácico esquerdo de um felino, macho, SRD.....	34
Figura 7 – Lesão em MTE de um felino, em processo cicatricial.....	35
Figura 8 – Lesão em processo cicatricial avançado em MTE	35
Figura 9 – Membro torácico esquerdo de um felino, macho, SRD.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SC = Subcutânea

IM = Intramuscular

MI = Mililitro

Cm = Centímetros

Mm = Milímetro

FA = Fosfatase Alcalina

ALT = Alanina Aminotransferase

OZ = Ozônio

Kg = Quilos

Mg = Miligrama

g = Gramas

µg = Micrograma

SRD = Sem Raça Definida

BID = 2 vezes ao dia

TID = 3 vezes ao dia

SID= 1 vez ao dia

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

O2 = Oxigênio

O3 = Ozônio

GC = Grupo Controle

PFGF = Fator de crescimento derivado das plaquetas

TGF-B = Fator de crescimento transformador beta

VEGF= Fator de crescimento derivado do endotélio

ICF = Índice de cicatrização de feridas

INOS = óxido nítrico sintase

induzidaHO-1 = heme oxigenase 1

HIF 1 = fator de transcrição induzido por hipóxia

OHB = oxigênio hiperbárico

H.E = Hematoxilina-Eosina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
®	Registered
%	Porcentagem
≤	Menor ou igual
<	Menor do que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAS E MÉTODOS	19
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	20
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE FERIDAS	20
3.4 PROTOCOLO DE OZONIOTERAPIA	21
3.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	21
3.6 ANÁLISES	22
3.6.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DA EVOLUÇÃO DA FERIDA	22
3.6.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE CICATRIZAÇÃO DA FERIDA (ICF)	22
3.6.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	23
3.6.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA	23
3.6.5 AVALIAÇÃO DA ÁREA DO TECIDO SEMELHANTE À DERME	24
3.6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	24
4 RESULTADOS	25
4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DA EVOLUÇÃO DA FERIDA	25
4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE CICATRIZAÇÃO DA FERIDA (ICF)	25
4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA	26
4.4 ÁREA DE TECIDO SEMELHANTE À DERME	27
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	30
7 RELATO DE CASO	31

8 ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS DURANTE A INICIAÇÃO CIENTÍFICA.....	38
8.1 PUBLICAÇÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO	39
9 REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Lesões cutâneas como as queimaduras e úlceras, são feridas muito comuns na rotina da medicina veterinária e podem ser provocadas por danos, térmicos, mecânicos ou físicos ou doenças metabólicas e, frequentemente acabam em necrose tecidual, aumento do grau de dor, incapacidade ou até mesmo morte (REZAIE *et al.*, 2019; BORENA *et al.*, 2015; GURTNER *et al.*, 2008). As feridas na pele podem ser denominadas como feridas agudas e crônicas. As feridas agudas, geralmente, reparam de maneira espontânea e eficiente (DEMIDOVA-RICE, HAMBLIN & HERMAN 2012). Entretanto, na presença de algumas situações específicas, como má alimentação, doenças associadas, idade ou amplitude da lesão, o processo de reparação da pele pode ser impedido, tornando-se feridas crônicas ou não cicatrizadas (CHILDS & MURTHY, 2017; BUSANELLO-COSTA *et al.*, 2020).

A terapia com ozônio (O₃), ou seja, a ozonioterapia é um método de tratamento conhecido há muitos anos, empregada desde o século XIX, e, na contemporaneidade, é uma prática aprovada em vários países, como os europeus, Japão e Cuba. O O₃ é uma molécula composta por três átomos de oxigênio (O), sendo a terceira potência oxidante de estrutura dinamicamente instável que se decompõe rapidamente em moléculas de oxigênio (O₂) e em um átomo de oxigênio, altamente reativo. Apresenta uma meia-vida de 40 minutos a 20°C e cerca de 140 minutos a 0°C (BORRELLI; BOCCI, 2018; BOCCI *et al.*, 2015; BOCCI, 1994; BOCCI, 2011).

Os geradores de ozônio de uso médico utilizam o princípio de descarga elétrica do tipo corona que emprega o uso de uma mistura gasosa de O₂ medicinal/O₃ que, de acordo com a literatura, possui potencial terapêutico para diferentes situações clínicas (BOCCI *et al.*, 2015).

Trata-se de um procedimento que usa o gás ozônio, aplicado por diversas vias, subcutânea (SC); intramuscular (IM); Intradiscal; intracavitária (espaços peritônio e pleural); intravaginal, insuflação retal, intrauretral e vesical, auto-hemoterapia ozonizada e, também pela via tópica, por meio de água e óleo ozonizado ou além disso, pela aplicação direta, método conhecido como “bag”, com o auxílio de sacos plásticos envolvendo a lesão (BORRELLI; BOCCI, 2018; ZANARDI *et al.*, 2016; BOCCI, 1994; SILVA *et al.*, 2018).

Ao penetrar no organismo, o ozônio reage muito rápido com ácido graxos poliinsaturados presente na membrana celular e estimula a produção de ozonídeos, responsáveis por ativar moléculas sinalizadoras nucleares (SILVA *et al.*, 2018). Os ozonídeos formados são capazes de modular condições inflamatórias, possui ações antioxidantes, analgésicas, imunomodulatórias e angiogênicas, assim como propriedades antimicrobianas (inativação de bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários), podendo assim ser aplicada no controle e tratamento de inúmeras doenças com diferentes causas etiológica (CARDOSO *et al.*, 2010; VILARINDO *et al.*, 2013). Dentre essas, ressalta-se sua aplicabilidade como terapia promissora no tratamento de feridas cutâneas devido sua ação antimicrobiana e reparadora (BORRELLI; BOCCI, 2018; ZANARDI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

Um estudo de caso que associou essa terapia com curativos com óleo de girassol e creme ozonizados, revelou que esta associação é capaz de promover redução do exsudato purulento, formação rápida de tecido de granulação, reparação de grande área da ferida e alívio da dor, alcançando a total cicatrização em cerca de 90 dias (CARDOSO *et al.*, 2010). Velano *et al.* (2001), relatam que o ozônio tem sido considerado um microbicida eficaz agindo sobre bactérias e fungos, sendo que, o ataque primário a estes micro-organismos se dá sobre a parede celular e, posteriormente, ao penetrar no interior da célula, este agente promove a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucléicos provocando sua lise. Assim, estes autores realizaram um estudo *in vitro* que avaliou o efeito do gás ozônio, dissolvido em água, numa concentração de 0,6mg/l, sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos mostraram que o tempo máximo para a inativação total das bactérias tratadas com água previamente ozonizada foi de 5'25''.

Ainda a literatura tem apresentado outros benefícios da utilização da ozonioterapia no processo de feridas cutâneas. Entre estes, podemos mencionar um aumento local no número médio de fibroblastos, melhora a capacidade de transporte de oxigênio (O₂) pelos eritrócitos, neoangiogênese, ademais de estimular o sistema imunológico, fazendo-se assim essa terapia um importante instrumento nesse cenário (GRACER *et al.*, 2005). O estudo experimental de Kim *et al.*, 2009, os autores demonstraram que a utilização de ozonioterapia em úlceras cutâneas foi eficaz em acelerar e estimular o processo de reparação do tecido epitelial. Por meio de técnicas histológicas foi possível destacar uma ativação e proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno a aumento da expressão de fatores de crescimento PFGF, TGF-β e

VEGF, os quais estão diretamente relacionados com o processo de cicatrização de feridas.

Além disso, um utilizando uso de óleo ozonizado em úlceras necróticas induzidas por um agente químico em ratos demonstrou redução da área da ferida e melhora da cicatrização do tegumento (KESIK *et al.*, 2016). Já, Bocci (2006) afirma que a constante aplicação de ozônio em concentrações progressivamente baixas ao longo dos dias de tratamento atua diretamente em todas as fases inflamatórias da ferida prevenindo a superinfecção das mesmas, e também, estimulando a proliferação celular, a síntese de fibronectina, colágeno e ácido hialurônico, estimulando assim a cicatrização da lesão.

No trabalho, publicado por Oliveira (2012) apresenta em sua revisão o benefício da ozonioterapia para tratamento de feridas cutâneas, sendo capaz de ser incorporada como um método seguro, de fácil manuseamento e pouco oneroso, na terapêutica de diversas lesões dermatológicas, dentre elas a úlcera por pressão, diminuindo assim os custos ao sistema de saúde e resultando em uma melhora na qualidade de vida do enfermo. Os principais resultados identificados em sua revisão foram: a cicatrização total da lesão e a estimulação do processo de cicatrização (62,2%), seguidos da melhora do aspecto da ferida (43,5%), diminuição da dor/ do sintoma (17,4%).

A aplicação do gás a nível subcutâneo também tem sido testada em trabalhos clínicos e em modelo experimental. Delgado *et al.*, (1997), aplicaram ozônio subcutâneo em 84 pacientes com lesões de herpes, promovendo redução da lesão e da dor. Efeito semelhante foi encontrado ao adicionar oxigênio ao ozônio, com redução de dor e edema (CECCHERELLI *et al.*, 1998). O estudo experimental de Fuccio *et al.*, (2009) aplicou ozônio subcutâneo em camundongos com dor neuropática cirurgicamente induzida, encontrando evidências de que uma única administração subcutânea de ozônio diminuiu o comportamento do tipo de dor neuropática, normalizou a expressão de enzimas pró inflamatórias, por mecanismos ainda desconhecidos, através da regulação dos genes que desempenham um papel central no início e manutenção da neuropatia. Os efeitos do pré-tratamento com ozônio na sobrevida do retalho de pele de ratos foram testados por Öksüz *et al.*, (2015), os quais aplicaram 1 mg / kg de ozônio via intraperitoneal por 7 dias. Os achados destes autores indicaram que o grupo experimental apresentou melhores medidas de área superficial, juntamente com os resultados histopatológicos e de

microscopia eletrônica, quando comparados ao grupo de controle, atribuindo tais resultados às propriedades antioxidantes, angiogênicas e vasodilatadoras do ozônio. Achados parecidos foram obtidos por Yildirim *et al.*, (2014), os quais analisaram a inflamação, isquemia e o edema, causado por trauma induzido em modelo experimental de úlceras e a resposta a terapêutica com oxigênio hiperbárico (OHB) e pela terapia com ozônio. Os escritores observaram a atividade do fator de hipóxia (HIF-1), atividade de HO-1, que apresenta ação anti-inflamatória, e atividade do óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que é concedida por macrófagos em condições de inflamação aguda. Os autores encontraram redução expressiva nos níveis de isoforma pro inflamatória iNOS nos grupos OHB e Ozônio.

Uma redução significativa na inflamação foi detectada tanto no grupo ozônio quanto OHB comparados com o grupo controle, e uma diminuição considerável no edema foi detectada em todos os grupos. Sendo assim, o uso do ozônio nesse estudo foi eficaz na regulação dos principais sinais e sintomas de feridas ulcerativas, além dos efeitos benéficos sobre os achados bioquímicos e histopatológicos (YILDIRIM *et al.*, 2014).

Desta forma, o uso dessa terapia na promoção do reparo tecidual e modulação do quadro inflamatório pode ser uma alternativa terapêutica viável e com grandes benefícios, desde o custo, alívio dos sintomas e até mesmo o tempo reduzido de tratamento. Assim, embasados na literatura atual, acredita-se que a ozonoterapia tem se demonstrado eficiente na redução da resposta bacteriana de feridas e estimula à reparação tecidual. Contudo, existe a necessidade de pesquisas que visem verificar os parâmetros que aplicação do gás ozônio durante o processo de cicatrização da pele, visto que os protocolos de tratamento ainda permanecem incertos na prática clínica.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da ozonioterapia sobre a reparação tecidual em modelo experimental de feridas cutâneas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos da ozonioterapia sobre os aspectos morfológicos e morfométricos de feridas cutâneas.

3 MATERIAS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado em parceria com o Laboratório de eletrotermofototerapia da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos com parecer nº 1363200718.

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a execução do estudo proposto, foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), da linhagem *Wistar*, machos, com três meses de idade e massa corpórea média de 300g, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Biociências da UNIFESP – Campus Baixada Santista. Durante todo o período experimental permaneceram em gaiolas coletivas, apropriadas de polipropileno padrão (48,7 x 33,1 x 21,4 cm), transparentes, agrupados em quatro animais por gaiola, sob condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura na faixa de 22^o-27^oC, ambiente higienizado), recebendo ração balanceada e água filtrada a vontade.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais:

- Grupo controle (GC) - (n = 10): os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de feridas, mas não receberam nenhuma intervenção terapêutica.
- Grupo ferida e tratamento com ozonioterapia (OZ) - (n = 10): os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de feridas e receberam a ozonioterapia.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE FERIDAS

As cirurgias foram realizadas de acordo com os princípios éticos de

instrumentação animal, sob condições padrão de assepsia e anestesia geral. Para a realização do procedimento, foi utilizado instrumental cirúrgico, campo cirúrgico, avental e luvas, todos estéreis, além de gorro e máscara. Previamente ao início da cirurgia, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg), xilazina (8 mg/kg), acepromazina (1 mg/kg) e fentanil (0,05 mg/kg) em uma única seringa e a dose foi calculada de acordo com o peso corporal de cada animal. Além disso, foi administrada no pré-operatório, via intraperitoneal, uma dose única do antibiótico cefalotina (60 mg/Kg). Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana com a extensão dos quatro membros e foi realizada no dorso dos mesmos a tricotomia digital. Em seguida, foi realizada a antissepsia com auxílio de gaze estéril embebida em iodo degermante 2% seguido de álcool 70% no foco cirúrgico. Dando sequência, para realização da ferida foi realizada a perfuração da pele utilizando um punch dermatológico de dimensões de 10 mm, respeitando como limites os ângulos inferiores das escápulas (OTTERÇO *et al.*, 2018). Ao término do procedimento os animais receberam analgésico cloridrato de tramadol subcutâneo (12,5 mg/Kg) e por 48h após a cirurgia por via oral (20 mg/Kg) ministrado a cada 4 / 8 horas. Após passado este período os animais foram avaliados 2 vezes ao dia e medicados somente aqueles que apresentavam sinais de dor. As avaliações periódicas foram realizadas segundo identificação de dor por expressão facial e comportamento.

3.4 PROTOCOLO DE OZONIOTERAPIA

Para o grupo tratado, foi utilizado o aparelho portátil de ozonioterapia (*Ozone Life* – São José dos Campos, São Paulo). Foi utilizado uma ponta injetora para aplicação de 12 ug/ml. A ozonioterapia foi administrada uma vez ao dia por via subcutânea na em dois pontos (cranial e caudal) na borda da lesão por um período de 4 dias consecutivos tendo início 15 minutos após a indução da lesão cirúrgica.

3.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao término do período experimental, no 4º dia após a indução da ferida, os animais foram submetidos à eutanásia com meio de sobredose de anestésico (injeção intraperitoneal de ketamina 240 mg/kg e xilazina 24 mg/kg). Para constatar a morte dos mesmos, foi realizada a verificação do batimento cardíaco, frequência respiratória

e reflexos que, devem estar ausentes no animal. Em seguida, um fragmento da pele (1 cm²) foi retirada, identificada e armazenada para processamento e utilização em análises posteriores. Cabe destacar que após a eutanásia, as carcaças dos animais foram descartadas em sacos brancos identificados com o símbolo de risco biológico, foram acondicionadas em freezer (- 20° C) e logo após destinadas a incineração por uma empresa responsável pela coleta do material.

3.6 ANÁLISES

3.6.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DA EVOLUÇÃO DA FERIDA

A análise macroscópica da ferida foi realizada diariamente com objetivo de investigação em relação às seguintes ocorrências: inflamação local, presença de fibrose ou líquido na cavidade, necrose e odor.

3.6.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE CICATRIZAÇÃO DA FERIDA (ICF)

A análise morfométrica do ICF foi realizada através de registros fotográficos nos dias 0^o e 4^o pós-operatório. Foi utilizada uma câmera digital no modo básico, sem flash, sem zoom e resolução de 8,0 megapixels. Para a padronização da distância da câmera à úlcera utilizou-se um suporte de alumínio distando 20 cm e perpendicular à úlcera. Uma régua disposta ao lado dos animais e junto à ferida foi utilizada para a padronização da unidade de área das lesões em mm². As imagens foram analisadas pelo software *Image J 1,45* (*Research Services Branch, Nacional Institutes of Health* – *NIH* (*Bethesda, Maryland, EUA*)). Após calculada as áreas das lesões pelo software *Image J*, realizou-se o cálculo do índice de cicatrização da ferida (ICF) pela seguinte fórmula: $\text{área inicial} - \text{área final} / \text{área inicial} * 100$. Desta forma, o ICF foi expresso em porcentagem (JINNO, et al.,2016).

3.6.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas permaneceram em soluções de formaldeído a 10% para a fixação durante 24 horas. Posteriormente foram lavadas em água corrente por 24 horas. Na sequência passaram por desidratação em solução crescente de álcool etílico a 70%, 90% e 100%. As peças foram mantidas imersas por 1 hora nas soluções. Após os banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por 1 hora e, em seguida, em 2 banhos de xilol puro, também por 1 hora cada banho. Após essa etapa, o material foi processado para a inclusão em parafina e posteriormente foram emblocados através de um micrótomo (*Leica RM – 2145, Germany*), sendo obtidas lâminas histológicas (cortes seriados) com 5 µm de espessura. Os cortes foram realizados em plano coronal à superfície da pele. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E.) para realizações das análises histológica qualitativa e área de tecido semelhante à derme, sendo considerada toda amostra.

3.6.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

A análise qualitativa da ferida cutânea foi feita por meio de lâminas coradas com H.E., sendo uma lâmina por animal com três cortes cada uma delas. Um corte por lâmina foi escolhido de maneira aleatória e foram analisados em três campos distintos com aumento de 200 X. Para tal análise, foi utilizado um microscópio de luz (*Carl Zeiss, Oberkochen, Germany*) e foram observados os seguintes critérios: infiltrado inflamatório, vascularização, proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e reepitelização. Essas avaliações foram definidas tendo como fundamento o estudo de Uzêda e Silva *et al.*, 2016.

3.6.5 AVALIAÇÃO DA ÁREA DO TECIDO SEMELHANTE À DERME

A área do tecido semelhante à derme recém-formada foi medida usando o *software Image J 1,45*. A mensuração foi realizada utilizando como limites laterais as regiões de transição entre as áreas da derme recém-formada e da derme íntegra; borda inferior a transição entre a área da derme recém *panniculus carnosus*; borda superior a região entre derme recém formada e epitélio. A área do tecido semelhante a derme foi expressa em mm².

3.6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

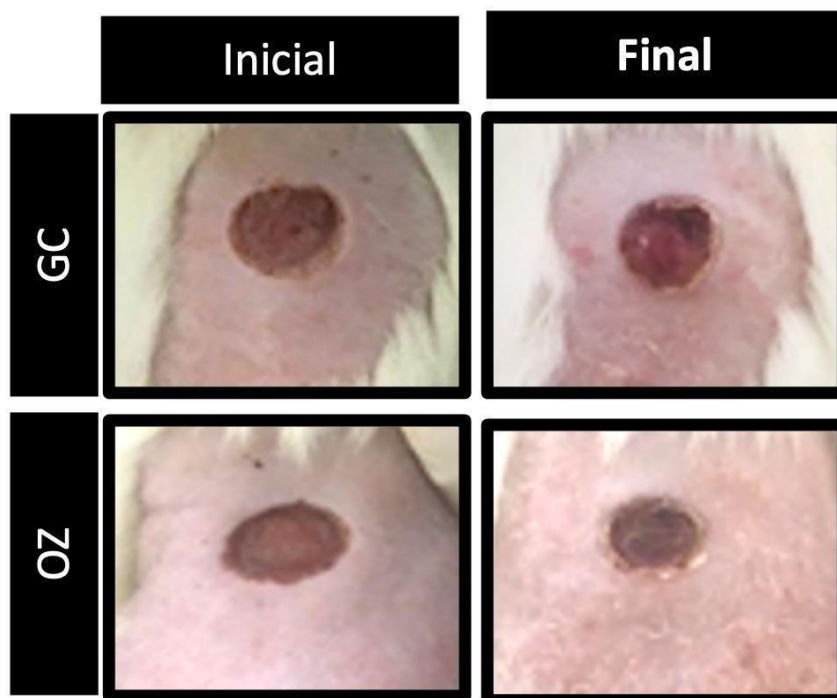
Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk's* foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações foram feitas utilizando testes *T Student*. Nos casos não paramétricos, o teste de *Mann-Whitney* foi adotado. As análises foram realizadas no software *GraphPad Prism*, versão 6.01. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DA EVOLUÇÃO DA FERIDA

Na figura 1, estão apresentados os achados macroscópicos obtidos a partir da análise qualitativa dos grupos experimentais no período experimental de 4 dias pós operatório. Foi possível observar ausência de necrose, inflamação local, odor, presença de fibrose ou líquido na cavidade da lesão em ambos grupos experimentais. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

Figura 1 – Resultados da análise macroscópica da ferida



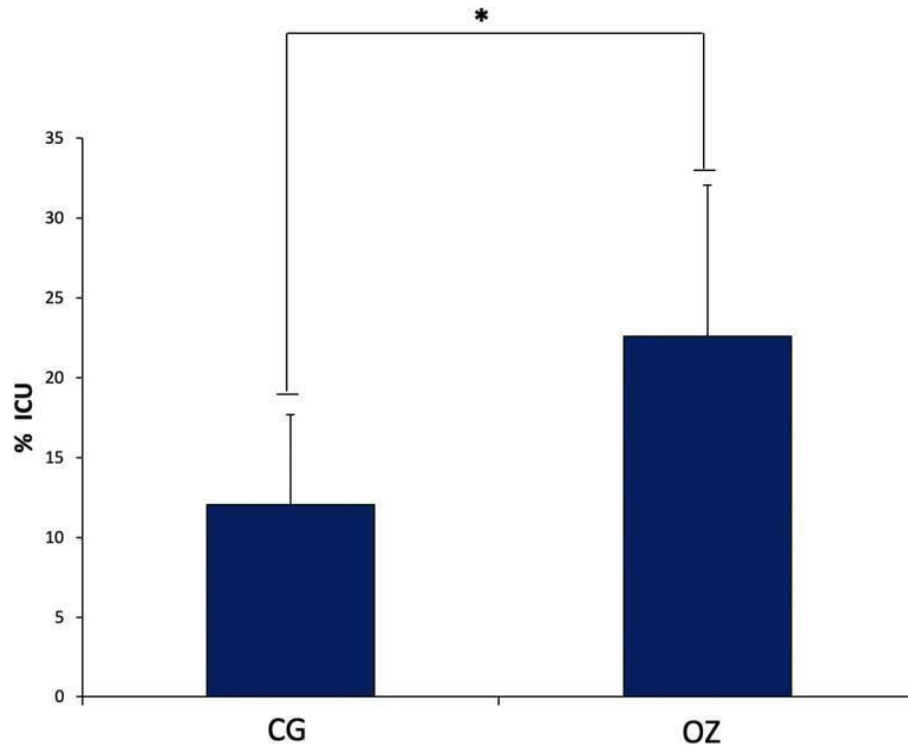
Grupo ferida controle (GC); Grupo ferida + ozonioterapia (OZ).

Fonte: Autoria própria

4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE CICATRIZAÇÃO DA FERIDA (ICF)

A figura 2, ilustra os valores obtidos para a análise do ICF. Foi observado um aumento da ICF no grupo que recebeu ozonioterapia (OZ – $p= 0,002$) quando comparado ao grupo controle (GC).

Figura 2 – Resultados da análise referente ao ICF



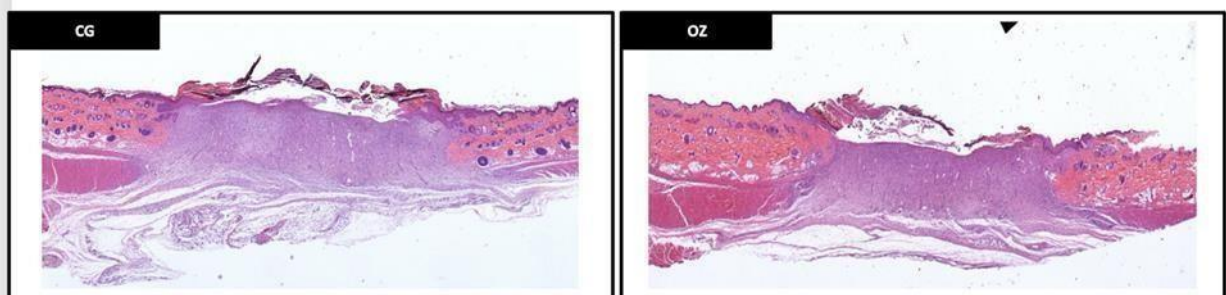
* $p < 0,05$ vs GC;. Grupo ferida controle (GC); Grupo ferida + ozonioterapia (OZ).

Fonte: Autoria própria

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

Figura 3, foi possível observar na análise histológica a presença de um moderado infiltrado inflamatório, intensa proliferação de fibroblastos, moderada deposição de colágeno, discreta formação de novos vasos e moderada reepitelização em ambos os grupos experimentais. Entretanto, no grupo tratado observou-se um menor infiltrado inflamatório quando comparado ao não tratado.

Figura 3 – Fotomicrografias representativas da análise histológica



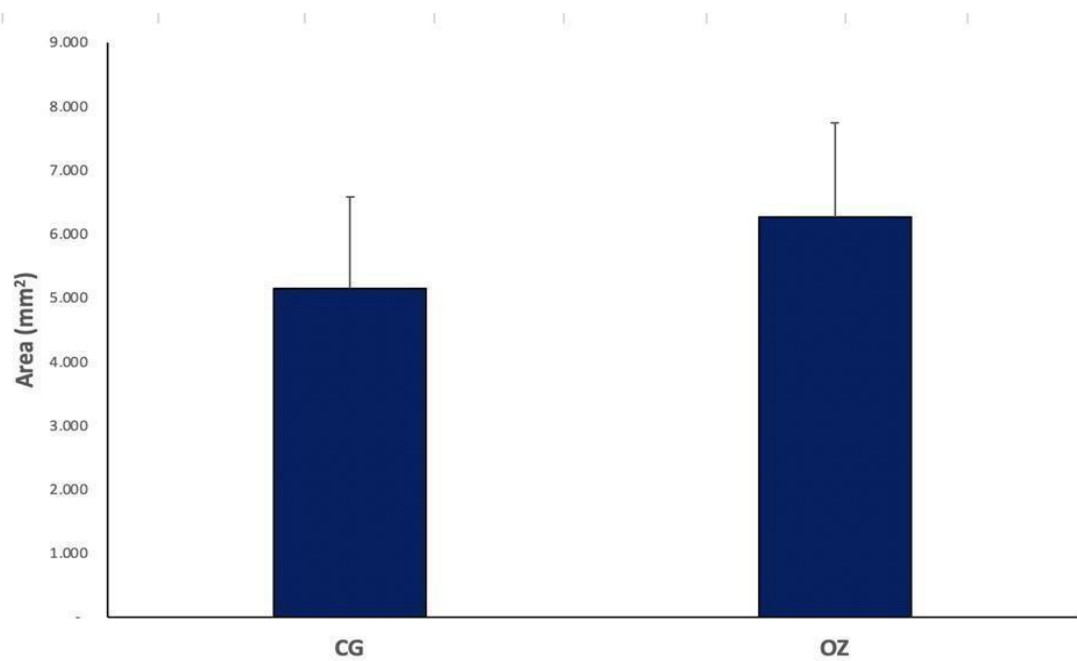
Grupo ferida controle (GC); Grupo ferida + ozonioterapia (OZ).

Fonte: Autoria própria

4.4 ÁREA DE TECIDO SEMELHANTE À DERME

Figura 4 pode-se observar os resultados da análise da área de tecido semelhante a derme. Não foi possível encontrar diferença entre os grupos.

Figura 4 – Gráfico representativo dos resultados da análise do tecido semelhante à derme



Grupo ferida controle (GC); Grupo ferida + ozonioterapia (OZ).

Fonte: Autoria própria

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da ozonioterapia sobre os aspectos morfológicos e morfométricos de feridas cutâneas. Com isso foi possível observar que a ozonioterapia obteve um maior índice de cicatrização da ferida (ICF), como também nas análises histológicas, foi notado um menor infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo que não recebeu terapia. Já nas análises de área de tecido semelhante à derme e análise macroscópica da evolução da ferida não foi notado grandes diferenças no período experimental analisado.

Como citado anteriormente, feridas cutâneas são muito frequentes na rotina médica veterinária, e que muitas vezes se tornam algo complexo. Essas podem ser causadas por diversas situações como, mordedura, traumas, procedimentos cirúrgicos, queimaduras, injúrias, abrasões, lacerações, entre outros (KORTING; SCHÖLLMANN; WHITE, 2011). Entretanto a maior complicação nas feridas cutâneas são o grau de contaminação, evoluindo para um quadro infeccioso e inflamação crônica, atrasando o processo de reparo tecidual.

A existência de bactérias nas feridas, mesmo quando não há infecção, pode acarretar um encadeamento de respostas locais e sistêmicas no hospedeiro, que com isso acabam causando um retardo na cicatrização, o que aumenta a exposição da lesão à contaminação por diferentes espécies bacterianas (SIBBALD *et al.*, 2003). Sabe-se que para os tratamentos convencionais é necessário o uso prolongado de antibióticos, entretanto, Calunga *et al.* (2007) afirmam a necessidade da procura por terapias alternativas, que auxiliem na melhora de qualidade de vida de pacientes portadores de lesões cutâneas. Ainda sobre o uso de antibioticoterapia, Pena (2006) em seu trabalho sobre dermatopatias em cães, fala sobre a grande resistência bacteriana aos antibióticos, acarretando remissões das doenças, sendo um grande problema na saúde pública, por muitos microrganismos serem de importância zoonótica.

A reparação tecidual é algo complexo que envolve vários processos como, ativação e proliferação celular e vascular. As feridas agudas são ocasionadas normalmente, por trauma externo e de modo geral recuperam-se em curto período de tempo, evoluindo mediante há uma série natural de fases, envolvendo inflamação e granulação, para reepitelização e remodelagem. Já as feridas crônicas, a cicatrização

não ocorre de maneira esperada, uma lesão crônica contaminada com uma população microbiana persistente, a resposta inflamatória produz um influxo crônico de neutrófilos que liberam enzimas citolíticas, radicais livres de oxigênio e mediadores inflamatórios que lesionam o tecido do hospedeiro. Ocasionalmente a diminuição de oxigenação nesses tecidos lesados, necrose e morte celular, onde acaba gerando um ambiente propício ao desenvolvimento de microorganismos (SIBBALD *et al.*, 2003).

A ozonioterapia vem sendo utilizada com muita frequência em lesões cutâneas, além dos seus benefícios como potente agente antimicrobiano, os efeitos terapêuticos da ozonioterapia auxiliam em melhor oxigenação tecidual, assim, estimulando a produção de citocinas, contribuindo para a síntese de anticorpos, ativação de linfócitos T, redução da adesão plaquetária, além do mais, ele atua como analgésico, contribuindo como anti-inflamatório, estimulando o crescimento do tecido de granulação através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), favorecendo benefícios a reparação tecidual e contribuindo para melhor crescimento epitelial (LAKE *et al.*, 2004; TRAINA, 2008). Além disso, muitos estudos concordam que a terapia com ozônio evita os efeitos negativos resultantes do uso prolongado de antibióticos. (OGATA, *et al.*, 2000).

Nas análises histológicas do presente estudo, foi observado a presença de moderado infiltrado inflamatório, moderada deposição de colágeno, intensa proliferação de fibroblasto, discreta angiogênese e moderada reepitelização em ambos os grupos, entretanto no grupo tratado com ozonioterapia, foi observado um menor infiltrado inflamatório. A formação de novos vasos sanguíneos é de suma importância para o processo de reparo da ferida, sendo através deles que será feita a nutrição e oxigenação do tecido lesado. Ainda, a proliferação de fibroblastos também tem um papel importante nesse processo, pois juntamente com o aumento vascular, formam o tecido de granulação, etapa essencial para o fechamento e resolução da lesão.

Nas análises do índice de cicatrização da ferida (ICF), no grupo que recebeu o tratamento com ozonioterapia foi notado um aumento, em relação ao grupo sem intervenção terapêutica. Acredita-se que a ozonioterapia tenha otimizado a regeneração dos tecidos lesionados, auxiliando o fechamento das lesões cutâneas (MEHLMAN e BOREK, 1987; TRAVAGLI *et al.*, 2010).

Em um trabalho realizado por Sanguanini (2019), no qual foi utilizado água e óleo ozonizado no reparo tecidual de feridas cutâneas, obtiveram resultados favoráveis, em que as duas formas de ozônio favoreceram o processo de reparo. No

estudo, o óleo ozonizado promoveu maior retração e neovascularização na ferida, já a água auxiliou nas fases de proliferação e remodelamento da cicatrização. Em outro estudo, desenvolvido por Moura (2020), no qual foi realizado um relato de caso com uso de ozonioterapia pela técnica de insuflação de bags, solução fisiológica ozonizada e óleo de girassol ozonizado como tratamento de lesões de esporotricose felina, no qual já havia iniciado com o tratamento convencional com banhos semanais com xampu antifúngico de miconazol, além das limpezas e curativos e o antifúngico itraconazol, onde apenas com esse tratamento não estavam obtivendo resultados positivos em relação a cicatrização e remodelamento das feridas em 40 dias de tratamentos, portanto decidiram entrar com a ozonioterapia, que em apenas 10 sessões, sendo 3 em cada semana, alcançaram resultados positivos em cicatrização, remodelamentos das feridas, crescimento de pelos, tecidos viáveis, sem edema ou sinal de inflamação.

Contudo, por mais que a ozonioterapia já venha sido muito utilizada como terapia alternativa, ainda há necessidade de mais estudos, que comprove sua eficácia, investigando mais a fundo suas ações, a nível molecular e celular, assim como nos parâmetros de aplicação para uma prática segura e efetiva na medicina veterinária.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo de terapia com ozônio utilizado no presente estudo, apresentou um efeito positivo no processo de reparação tecidual em feridas cutâneas. Assim, a ozonioterapia demonstra um grande potencial reparador, pode constituir um excelente coadjuvante no tratamento de úlceras. Apesar disso, se faz necessário mais estudos, para que assim tenhamos resultados mais conclusivos em relação ao seu mecanismo de ação.

7 RELATO DE CASO

No dia 22/12/2022 foi atendido no Hospital Veterinário Animale, localizado em Mauá-SP, consulta oncológica, um felino, macho, SRD, com 9 anos de idade, pesando 5,7kg. O paciente era domiciliado e não tinha acesso a rua.

O motivo pelo qual o animal deu entrada no hovet, foi por uma lesão ulcerativa em membro torácico esquerdo, com progressão desde 2021, que não cicatrizava e já tentou tratar, porém não obteve melhora.

O animal apresentava duas lesões em membro torácico esquerdo em região distal, lesões ulceradas, membro edemaciado com sinais de inflamação e crostas.

No exame físico paciente em bom estado geral, normodipsia, normorexia, normoquesia e sem êmese, temperatura corporal de 38,1 °C, mucosas normocoradas, linfonodos não reativos. Principal suspeita da Dra era Carcinoma Espinocelular.

A médica veterinária solicitou exames laboratoriais ao tutor, hemograma e bioquímicos, cultura e antibiograma e citologia da lesão.

Até que resultados de exames saíssem, foi prescrito para casa tratamento comanalgésico Cronidor® 12mg (1 comprimido, por via oral, BID por 7 dias) omega3 Oxcell® 500 (1 capsula, por via oral, até novas recomendações) calmante natural Anizen (2 borrifadas, em cavidade oral, TID até novas recomendações) e Tergenvet® para limpeza da lesão, uso tópico (SID até novas recomendações).

Paciente retornou no dia 29/12/2022, para avaliação da cicatrização da lesão cutânea e resultado da citologia, onde apresentou resultado negativo para neoplasia nas amostras analisadas e infiltrado inflamatório crônico-ativo rico em células gigantes multinucleadas. Em avaliação, feridas menos infeccionadas após tratamento. Exames hematológicos sem alterações relevantes. Portanto foi iniciado novo tratamento, compomada cicatrizante Colagenase com Cloranfenicol, uso tópico (BID até novas recomendações) e anti-inflamatorio esteroidal Prednisolona 5mg (1 Comprimido, por via oral, SID por 7 dias).

Após algumas semanas, paciente retornou para avaliar resultado de cultura e antibiograma, onde foi constatado bactéria *Staphylococcus coagulase*, sensível para todos antibióticos testados. Sendo assim, prescrito para o paciente antibiótico, Agemoxi CL® 250mg (1/2 comprimido, por via oral, BID por 21 dias) e antiemético Vonau® 4mg (1 comprimido, por via oral, BID em caso de êmese).

Paciente retornou ao HOVET Animale no dia 26/01/2023 queixando de que havia feito medicações e limpeza da ferida como recomendado, porém lesão não

cicatrizava. Sendo assim foi solicitado que continuasse com a pomada colagenase por mais 10 dias e se mesmo após esse período, não houvesse melhora em processo de cicatrização, indicado realizar histopatológico da lesão, para um melhor diagnóstico e resolução do caso.

Após 14 dias, paciente retornou novamente com a mesma queixa de que ferida em membro torácico esquerdo não cicatrizava, solicitado cirurgia para histopatológico, porém tutor do paciente antes de submeter animal a tal procedimento, preferiu tentar curativo com Biatain® Alginato.

Paciente ficou frequentando o hospital durante 3 semanas para trocas de curativo semanal. Entretanto no dia 15/03/2023, retornou para uma nova consulta alegando que ferida não cicatrizava, foi então realizado histopatológico e novos exames laboratoriais, hemograma e 5 bioquímicos: creatinina, uréia, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e proteína totais. No hemograma e nos bioquímicos não houve alterações significativas.

Em resultado de exame histopatológico constou como dermatite piogranulomatosa multifatorial severa, portanto, paciente foi encaminhado para consulta com dermatologista.

No dia 12/04/2023, paciente realizou a primeira consulta com dermatologista, que após examinar paciente, iniciou um novo tratamento, anti-inflamatório esteroidal, Predsim® gotas (20 gotas, por via oral, SID por 7 dias) e antibiótico tópico, Rifocina spray e curativo com açúcar, para estimular tecido de granulação (BID por 7 dias).

Em retorno, após 7 dias de tratamento, ferida sem infecção e, com tecido de granulação ativo. Prescrito para casa óleo ozonizado e açúcar, uso tópico (SID até cicatrização). Paciente retornou um mês, após tratamento onde em avaliação física da ferida, não havia cicatrizado, receitado novamente anti-inflamatório esteroidal, Predisim® (20 gotas, por via oral, SID por 7 dias) e limpeza da ferida com clorex 1% e açúcar SID.

Tutor retornou no dia 28/06/2023, onde cicatrização estava em andamento, mantido tratamento anterior de limpeza e pomada Cicaplast Baume. Em 09/08/2023 paciente retornou em consulta dermatológica ao Hovet animale onde lesão ainda estava ativa, sem sinal de cicatrização, sendo assim, o paciente foi encaminhado para ozonioterapia, com intuito de acelerar processo cicatricial e que houvesse uma cicatrização eficiente da lesão.

No dia 14/08/2023 paciente retornou ao Hovet Animale para dar início ao tratamento da lesão com ozonioterapia. Foi estabelecido então, tratamento semanal,

nas vias intra retal e insuflação de bag. Inicialmente, na primeira sessão realizado apenas via intra retal, na concentração mínima de $4\mu\text{g}$ e 3ml/kg .

Figura 5 – Lesão em membro torácico esquerdo de um felino, macho, SRD



Uma semana após primeira sessão de ozonioterapia.

Fonte: Autoria própria

Nas demais semanas, que totalizaram 9 sessões, foi dado início a bag, assim sendo realizado na concentração de $12\mu\text{g/ml}$. O tempo de aplicação era de 5 minutos com o gerador ligado e prosseguia por mais 10 minutos com o gerador desligado, fazendo o ozônio ser disseminado pela bag. Essa manobra era realizada duas vezes, totalizando um tempo de 30 minutos de insuflação de bag.

Figura 6 - Membro torácico esquerdo de um felino, macho, SRD



Insuflação de bag para administração de ozônio em felino acometido por dermatite piogranulomatosa multifatorial severa.

Fonte: Autoria própria

Na quarta sessão de ozonioterapia o paciente já apresentava uma boa evolução no processo de cicatrização da ferida, com aparecimento de tecido granulomatoso viável, sem sinais de infecção ou inflamação, tecido de coloração rósea e com bom crescimento de pelos.

Figura 7 – Lesão em MTE de um felino, em processo cicatricial



Quarta sessão de ozonioterapia.
Lesão com tecido viável e com bordas aproximadas.
Fonte: Autoria própria

O paciente apresentava melhora significativa do quadro em um curto período de tempo. Na oitava sessão de ozonioterapia a lesão em membro torácico esquerdo já apresentava praticamente total remissão, quase todo preenchida por pelos.

Figura 8 – Lesão em processo cicatricial avançado em MTE de um felino.



(A) Membro torácico esquerdo, após 8 sessões. (B) Membro torácico esquerdo após 9 sessões.
Lesões com crescimento de pelo e, ferida cicatrizada quase que completa.

Fonte: Autoria própria

Foram totalizadas 10 sessões no dia 16/10/2023. A lesão do membro torácico esquerdo estava totalmente cicatrizada, com cobertura total de pelos. Portanto paciente recebeu alta.

Figura 9 - Membro torácico esquerdo de um felino, macho, SRD



Decima e última sessão de ozonioterapia. Lesão completamente cicatrizada e coberta por pelos.

Fonte: Autoria Própria

O paciente permaneceu de colar elizabetano durante todo o tratamento, a fim de evitar que o mesmo lambesse o membro acometido com as lesões, também durante o tratamento foi mantido apenas limpeza diária da ferida com solução fisiológica NaCl 0,9%, sem nenhum outro tipo de tratamento além da ozonioterapia.

No relato de caso aqui descrito, o emprego da ozonioterapia no tratamento da lesão cutânea no membro torácico esquerdo do felino, foi de suma importância para que houvesse regeneração total da ferida, visto que já havia sido tratado com terapias convencionais, como uso de corticosteroides, antibióticos, terapia com açúcar entre outros tipos terapêuticos comuns empregadas em feridas. Entretanto, só após o uso da ozonioterapia, foi observado melhora no processo cicatricial da lesão, como maior crescimento de tecido de granulação, melhor coloração da lesão, crescimento de pelos no local acometido, desinfecção da ferida e cicatrização total da lesão, sem que houvesse remissão. Travagli *et al.* (2010) apontam recuperação significativa no uso de ozonioterapia como tratamento de feridas e úlceras extensas e de difícil cicatrização. Assim como em um estudo de caso realizado por Gonçalves *et al.*, (2020), apresentaram melhora na cicatrização das feridas, diminuição dos efeitos colaterais causados pelos medicamentos e ainda contribuiu na resposta imunológica do animal, quando empregado o uso de ozonioterapia para tratamento coadjuvante de leishmaniose canina.

8 ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS DURANTE A INICIAÇÃO CIENTÍFICA

O presente trabalho intitulado: aplicação subcutânea da ozonioterapia no processo de reparação tecidual em modelo experimental de feridas cutâneas em ratos, foi apresentado (apresentação oral) no i congresso acadêmico e tecnológico da universidade brasil, vii encontro na iniciação científica.

Tania Quintal está apresentando

UB **CNPq**

I CONTEC BRASIL
I CONGRESSO ACADÊMICO E TECNOLÓGICO DA UNIVERSIDADE BRASIL
VII Encontro de Iniciação Científica
VII Encontro de Pós-Graduação
04 e 05 de Dezembro de 2020

APLICAÇÃO SUBCUTÂNEA DA OZONIOTERAPIA NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS

Tânia Maria Quintal Muniz¹; Carolina Carla Cruz Marcelino¹; Carla Roberta Tim^{1,2}; Marcia Alves Elisei Guimarães²; Livia Assis^{1,2}
¹Medicina Veterinária, Universidade Brasil, Campus Itaquera, SP
² Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica, Campus Itaquera, SP

Ativar o Windows
Assim Configurar seu Windows

São Paulo
04/12/2020

Você

Gassia Orlandi

Tania Quintal

Gabriel Pinheiro P...

J

Joao Batista Fern...

Catarina Fossatto

Thiago de Oliveira ...

Luiz Sergio Vanzela

8.1 PUBLICAÇÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Research, Society and Development, v. 9, n. 10, e9909109369, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.9369>

Benefícios do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) associado a terapia de fotobiomodulação a LED no reparo tecidual de feridas cutâneas

Benefits of Epidermal Growth Factor (EGF) associated with LED photobiomodulation therapy in tissue repair of skin wounds

Beneficios del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) asociado con la terapia de fotobiomodulación LED en la reparación tisular de heridas cutâneas

Recebido: 17/10/2020 | Revisado: 24/10/2020 | Aceito: 27/10/2020 | Publicado: 29/10/2020

Márcia Busanello-Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8220-6405>

Universidade Federal de São Paulo, Brasil

E-mail: mbusanellocosta@gmail.com

Ana Claudia Muniz Rennó

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2358-0514>

Universidade Federal de São Paulo, Brasil

E-mail: acmr_ft@yahoo.com.br

Cintia Cristina Santi Martignago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3980-6354>

Indústria Brasileira de Equipamentos Eletromédicos, Brasil

E-mail: csantimartignago@yahoo.com.br

Carla Roberta Tim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4745-9375>

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

E-mail: carla.tim@universidadebrasil.edu.br

Tania Maria Quintal Muniz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9110-0431>

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

E-mail: quintal_muniz@hotmail.com

Carlolina Carla Cruz Marcelino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5983-4013>

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

E-mail: carolinamarcelino0210@yahoo.com

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOCCI, V. **Autohaemotherapy After Treatment Of Blood With Ozone.** A Repraissal. J. Int. Med. Res., v.22, p.131-144, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8088420/>. Acesso em 21 fev. 2021. DOI: 10.1177/030006059402200301

BOCCI, Velio Alvaro. **Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art.** Archives of medical research, v. 37, n. 4, p. 425-435, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16624639/>. Acesso em: 18 abr. 2023. Doi: 10.1016/j.arcmed.2005.08.006

BOCCI, Velio et al. **Validity of oxygen-ozone therapy as integrated medication form in chronic inflammatory diseases.** Cardiovascular & Haematological Disorders Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders), v. 15, n. 2, p. 127-138, 2015.

BOCCI, Velio. **Ozone. A new medical drug.** 2. ed. Siena: Springer, 2011. 132 p. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-90-481-9234-2>. Acesso em 28 mar. 2021.

BORENA, B. M., Martens, A., Broeckx, S. Y., Meyer, E., Chiers, K., Duchateau, L., & Spaas, J. H. (2015). **Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments.** *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 36 (1), 1–23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25924569/>. Acesso em: 15 ago. 2023. DOI: 10.1159/000374049.

BORRELLI, Emma; BOCCI, Velio. **The Use of Ozone in Medicine.** Ann Med Health Sci Res. v. 8, p. 117-119, 2018. Disponível em: <https://www.amhsr.org/articles/the-use-of-ozone-in-medicine-4493.html>. Acesso em: 15 mar. 2023.

BUSANELLO-COSTA, M.; RENNÓ, A. C. M. .; MARTIGNAGO, C. C. S. .; TIM, C. R. .; MUNIZ, T. M. Q. .; MARCELINO, C. C. C. .; ASSIS, L. . **Benefits of Epidermal Growth Factor (EGF) associated with LED photobiomodulation therapy in tissue repair of skin wounds.** *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 9, n. 10, p. e9909109369, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/9369>. Acesso em: 25 feb. 2021. DOI: 10.33448/rsd-v9i10.9369.

CALUNGA FERNÁNDEZ, José Luis et al. **Ozonoterapia combinada en el tratamiento del paciente portador de hernia discal lumbar: estudio preliminar.** *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, v. 26, n. 1, p. 0-0, 2007. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002007000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es. Acesso em 23 mar. 2021.

CARDOSO, Claudia Catelani et al. **Ozonoterapia como tratamento adjuvante na ferida de pé diabético.** *REVISTA MÉDICA DE MINAS GERAIS-RMMG*, v. 20, n. 4 Especial, 2010. Disponível em: <https://rmmg.org/artigo/detalhes/1184>. Acesso em 18 jul. 2023.

CECCHERELLI, Francesco et al. **Analgesic effect of subcutaneous administration of oxygen-ozone. A blind study in the rat on the modulation of the capsaicin-induced edema.** *Acupuncture & electro-therapeutics research*, v. 23, n. 3-4, p. 171-184, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10193702/>. Acesso em: 10 ago. 2023.

CHARLES CHAPLIN. **Vida e Pensamentos.** Editora Martin Claret. 1997. p. 118.

CHILDS, D. R., & Murthy, A. S. (2017). **Overview of Wound Healing and Management.** *The Surgical clinics of North America*, 97 (1), 189-207. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.suc.2016.08.013>. Acesso em: 23 jun. 2021.

DELGADO, J. et al. **Subcutaneous ozone therapy in the treatment of simplex herpes.** In: *Abstr. 2nd International symposium on Ozone Applications.—Havana, Cuba. 1997. p. 62.*

DEMIDOVA-Rice, T. N., Hamblin, M. R., & Herman, I. M. (2012). **Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care.** *Advances in skin & wound care*, 25 (7), 304–314. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22713781/>. Acesso em: 10 ago. 2023.

FUCCIO, Carlo et al. **A single subcutaneous injection of ozone prevents allodynia and decreases the over-expression of pro-inflammatory caspases in the orbito-frontal cortex of neuropathic mice.** *European journal of pharmacology*, v. 603, n. 1- 3, p. 42-49, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19100257/>. Acesso em: 12 ago. 2023. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.11.060

GONÇALVES, Jéssica & PAIVA, Priscila & OLIVEIRA, Lyana. **Uso da ozonioterapia como auxiliar no tratamento de cão portador de leishmaniose: relato de caso.** *Pubvet*. v.14, n.1, a495, p.1-5, Jan., 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339833482_Uso_da_ozonioterapia_como_auxiliar_no_tratamento_de_cao_portador_de_leishmaniose_relato_de_caso. Acesso em 11 set. 2023. DOI: 10.31533/pubvet.v14n1a495.1-4

GRACER, R. I.; BOCCI, V. **Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process?** *Medical hypotheses*, v. 65, n. 4, p. 752-759, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15951134/>. Acesso em; 15 set. 2022. DOI: 10.1016/j.mehy.2005.04.021

GURTNER, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. **Wound repair and regeneration.** *Nature*, 453 (7193), 314–321., 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature07039>. Acesso em 10 set. 2023.

JINNO, C., MORIMOTO, N., ITO, R., SAKAMOTO, M., OGINO, S., TAIRA, T., & SUZUKI, S. **A Comparison of conventional collagen sponge and collagen-gelatin sponge in wound healing.** *BioMed research international*, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27218103/>. Acesso em 25 ago. 2021. DOI: 10.1155/2016/4567146

KESIK, Vural et al. **Ozone Ameliorates Doxorubicine-Induced Skin Necrosis-**

results from an animal model. The international journal of lower extremity wounds, v. 15, n. 3, p. 248-254, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26286933/>. Acesso em 11 ago. 2023. DOI: 10.1177/1534734615597863

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 Jun;24(3):368-74. Epub 2009 Jun 12. PubMed PMID: 19543419; PubMed Central PMCID: PMC2698179. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19543419/>. Acesso em: 25 mai. 2023. DOI: 10.3346/jkms.2009.24.3.368

KORTING, H. C.; SCHÖLLMANN, C.; WHITE, R. J. **Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment.** Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, v. 25, n. 2, p. 130-137, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20626534/>. Acesso em: 23 ago. 2023. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2010.03775.x

LAKE, Jonathan Clive et al. **Efeito terapêutico da aplicação intra-ocular de ozônio em modelo experimental de endoftalmite por Staphylococcus epidermidis em coelhos.** Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, v. 67, n. 4, p. 575-579, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abo/a/DzrkFsM38zk8VQh7hwGf6Pf/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 13 set. 2023.

MEHLMAN, Myron A.; BOREK, Carmia. **Toxicity and biochemical mechanisms of ozone.** Environmental research, v. 42, n. 1, p. 36-53, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3803343/>. Acesso em: 15 jun. 2021. DOI: 10.1016/s0013-9351(87)80005-1

MOURA, Ana Luísa Gonçalves de. **Uso da ozonioterapia como auxílio no tratamento das lesões de esporotricose felina: relato de caso.** Orientador: Manuella Rodrigues de Souza Mello. 2020. 23f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, 2020. Disponível em: <https://dspace.uniceplac.edu.br/handle/123456789/604>. Acesso em 20 ago. 2021.

OGATA, A., & Nagahat, J. (2000). **Intramammary Application of Ozone Therapy to Acute Clinical Mastitis in Dairy Cows**. Theriogenology. Japan. 681-686. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10945283/>. Acesso em 20 out. 2023. DOI: 10.1292/jvms.62.681

OLIVEIRA, Luciane Marta Neiva de. **Utilização do ozônio através do aparelho de alta frequência no tratamento da úlcera por pressão**. Revista de Atenção à Saúde (antiga Rev. Bras. Ciên. Saúde), v. 9, n. 30, 2012. Disponível em: https://seer.uscs.edu.br/index.php/revista_ciencias_saude/article/view/1418. Acesso em: 25 set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.13037/rbcs.vol9n30.1418>

OTTERÇO, A. N., ANDRADE, A. L., BRASSOLATTI, P., PINTO, K., ARAÚJO, H., & PARIZOTTO, N. A. **Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats**. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, v.183, p. 22–29.2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29684717/>. Acesso em 15 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.010

ÖKSÜZ, Mustafa et al. **Effects of ozone pretreatment on viability of random pattern skin flaps in rats**. Journal of plastic surgery and hand surgery, v. 49, n. 5, p. 300-305, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25998721/>. Acesso em: 3 out. 2023. DOI: 10.3109/2000656X.2015.1047452

PENA, S. B. **Freqüência de dermatopatias infecciosas, parasitárias e neoplásicas em cães na região de garça**, São Paulo – Brasil. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária - ISSN 1679-7353. 2006. Disponível em: https://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/EXoo87Vkvjkz1eo_2013-5-21-15-45-39.pdf. Acesso em: 18 set. 2021.

REZAIE, F., Momeni-Moghaddam, M., & Naderi-Meshkin, H. (2019). **Regeneration and Repair of Skin Wounds: Various Strategies for Treatment**. The international journal of lower extremity wounds, 18 (3), 247–261. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31257948/>. Acesso em: 23 jul. 2023. DOI: 10.1177/1534734619859214

SANGUANINI, Rafael Cavalcante. **Efeitos da água e do óleo ozonizados no reparo tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos**. 2019. 53f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás,

<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/10062/5/Dissertação%20-%20Rafael%20Cavalcante%20Sanguanini%20-%202019.pdf>. Acesso em: 15 out. 2023.

SIBBALD, R. G.; ORSTED, H.; SCHULTZ, G. S.; COUTTS, P.; KEAST, D. **Preparing the wound bed 2003: focus on infection and inflammation**. *Ostomy/ Wound Management*, v. 49, n. 11, p. 24-51, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14652411/>. Acesso em 17 set. 2021.

SILVA, T. C. d., SHIOSI, R. K. & RAINERI Neto, R. (2018). **Ozonioterapia: um tratamento clínico em ascensão na medicina veterinária-revisão de literatura**. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, 15. Sousa, C. M. H. S. & Winck, C. A. (2018). Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-738130>. Acesso em: 15 set. 2023.

TRAINA, Andréia Aparecida. **Efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2008. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23149/tde-08042009-150340/publico/AndreiaATraina.pdf>. Acesso em 15 ago. 2021.

TRAVAGLI, Valter et al. **Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood**. *International Journal of Toxicology*, v. 29, n. 2, p. 165-174, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20335512/>. Acesso em 25 ago. 2021. DOI: 10.1177/1091581809360069

UZÊDA-E-SILVA, V. D., RODRIGUEZ, T. T., ROCHA, I. A. R., XAVIER, F. C. A., DOS SANTOS, J. N., CURY, P. R., & RAMALHO, L. M. P. (2016). **Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet**. *Lasers in Medical Science*, v.31, p.1363-1370. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27412288/>. Acesso em: 3 ago. 2023. DOI: 10.1007/s10103-016-1985-9

VELANO, Helena Engel et al. **Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao Staphylococcus aureus.** Pesquisa Odontológica Brasileira, v. 15, n. 1, p. 18-22, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pob/a/CHH79hwyPZdQXmKdn4SVhkn/abstract/?lang=pt>. Acesso em 15 jul. 2023.

VILARINDO, M. C., ANDREAZZI, M. A. & FERNANDES, V. S. (2013). **Considerações sobre o uso da ozonioterapia na clínica veterinária.** Paper presented at the Resumos do VIII EPCC-Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Maringá, Paraná, Brasil. Disponível em: http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2013/oit_mostra/Matheus_Carmo_Vilario.pdf. Acesso em 8 set. 2023.

YILDIRIM, Ali Osman et al. **Effectiveness of hyperbaric oxygen and ozone applications in tissue healing in generated soft tissue trauma model in rats: an experimental study.** Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery, v. 20, n. 3, p. 167-175, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24936837/>. Acesso em 12 jul. 2023. DOI: 10.5505/tjtes.2014.09465

ZANARDI, I. et al. **Ozone: a multifaceted molecule with unexpected therapeutic activity.** Current medicinal chemistry, v. 23, n. 4, p. 304-314, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26687830/>. Acesso em: 15 set. 2023. DOI: 10.2174/0929867323666151221150420