

ANDRÉIA APARECIDA TRAINA

**EFEITOS BIOLÓGICOS DO OZÔNIO DILUÍDO EM ÁGUA NA  
REPARAÇÃO TECIDUAL DE FERIDAS DÉRMICAS EM RATOS**

**São Paulo**

**2008**

**Andréia Aparecida Traina**

**Efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Faciais

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

**São Paulo**

**2008**

Catálogo-na-Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Traina, Andréia Aparecida

Efeitos biológicos da água ozonizada na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos / Andréia Aparecida Traina; orientador Maria Cristina Zindel Deboni. -- São Paulo, 2008.

122p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Ozônio 2. Irrigação localizada 3. Tecido animal 4. Ferimentos e lesões

CDD 617.605  
BLACK D76

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura:

E-mail:

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Traina AA. Efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, ...../...../.....

### Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

4) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

5) Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Titulação: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos meus estimados e queridos pais, **Jaime e Marilda**, exemplos de primeira grandeza na minha vida, e que sonharam antes de mim com as minhas vitórias.*

*Às minhas queridas irmãs, **Évelyn e Fabíola**, minhas melhores e eternas amigas, que sempre estão ao meu lado.*

*Tenho a certeza que estaremos sempre prontos para enfrentar todos os desafios que a vida nos apresenta, de forma corajosa e fraterna, para que possamos usufruir a nossa bela família.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*À minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni, pela amizade e atenção, pela colhida segura e incansável e pela preocupação com minha formação, desde a época acadêmica.*

*Um exemplo de pessoa, cirurgiã-dentista, professora e orientadora. A finalização deste trabalho é mais uma conquista que compartilhamos juntas, fruto de sua orientação.*

*Em nome da honra de ser seu discípulo, meu sincero agradecimento.*

*À Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem, por sua orientação na minha vida pessoal e profissional, e pelo privilégio de trabalhar ao seu lado.*

*Minha grande admiração.*

*Sempre serei imensamente grata às minhas professoras e amigas....*

*“Estimarei como aos meus próprios pais àquele que me ensinou esta arte”*

*(Juramento de Hipócrates, 460AC).*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Jaime e Marilda, e às minhas irmãs, Évelyn e Fabíola, pelo constante apóio, incentivo, carinho, amizade, compreensão, amor e pela linda família que compomos. Ao meu cunhado, Marcelo, a alegria que nos trouxe.

Aos docentes, aos alunos e aos pacientes da Disciplina de Cirurgia, pela participação na minha formação como cirurgiã-dentista, que me proporcionaram experiência didática para minha formação acadêmica. Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Campos pelas oportunidades oferecidas.

À Cida, Angela, Rose, Natália, Belira e Edson por todas perguntas respondidas.

Ao Prof. Dr. João Gualberto e a Dra. Lucimar pela orientação e oportunidade de utilizar o biotério.

Aos queridos amigos, Dr. Basile José Neto e a médica Dra. Vera Pozzani, que sempre me apoiaram na minha vida pessoal e profissional, agradeço a oportunidade de compartilharmos momentos juntos.

Ao Prof. Dr. Wilfredo Urruchi, que nortiou os passos técnicos iniciais desta linha de pesquisa.

Ao Dr. Leandro Botelha Hanna pela oportunidade de estarmos juntos e compartilharmos uma vida de muitas emoções e objetivos em comum.

A todos os meus queridos amigos que sempre estão ao meu lado, me ajudando e apoiando, e àqueles que contribuíram para a finalização deste trabalho.

Ao Departamento de Patologia Geral e Bucal que possibilitou a realização da parte laboratorial deste trabalho. À Profa. Dra. Luciana Correia pela excelente recepção e auxílio fundamentais para a elaboração desta pesquisa. Ao Prof. Dr. Décio das Santos Pinto Junior, por ter desprendido parte do seu tempo para realização das fotos. À Elisa e Bia que me guiaram na resolução dos mistérios de cada experimento no laboratório. A aluna de doutorado Renata Açaí, pela orientação e contribuição gentilmente concebidas.

À agência financiadora, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

Agradeço a Deus a oportunidade da vida, da saúde, de uma família feliz, de ter conhecido todas as pessoas aqui citadas e outras especiais, de ter seguido este caminho e, mais uma vez, conquistar um objetivo.

A FOUASP, a certeza de uma vez estado aqui, serei sempre daqui, me enche de alegria e muito orgulho...

Traina AA. Efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

## RESUMO

A ozonioterapia tem sido descrita como uma alternativa de tratamento para várias doenças por intervir possivelmente de forma favorável na reparação tecidual. A proposição desta pesquisa foi analisar os efeitos biológicos do ozônio diluído em água no processo de reparação tecidual, empregando duas concentrações diferentes. Foram realizadas feridas dérmicas padronizadas, com a utilização de punch, para excisão de fragmento da pele, com 5mm de diâmetro e profundidade, no dorso de 48 ratos. Os animais foram divididos em quatro grupos, conforme o tratamento realizado: em um grupo as feridas foram irrigadas com água ozonizada na concentração de 4ppm ( $GO_3>$ ), em outro foi utilizada água ozonizada na concentração de 1ppm ( $GO_3<$ ), no grupo controle positivo a água empregada não foi ozonizada ( $G_{\text{água}}$ ) e no controle negativo as lesões não receberam tratamento ( $G_{\text{nada}}$ ). As irrigações foram realizadas durante dez minutos no trans-operatório e durante cinco minutos no pós-operatório diário, e os animais foram sacrificados nos períodos de 2, 7 e 14 dias. Nestes momentos, as feridas foram fotografadas para avaliação macroscópica, sendo que as imagens foram analisadas por software de morfometria (ImageLab2000<sup>®</sup>), e os espécimes foram processados para avaliação microscópica, em análise histomorfológica, histomorfométrica (por meio do mesmo software) e imunistoquímica para anticorpo *colágeno tipo-I* e *anti-actina*. Todos os

dados foram submetidos a estudo quantitativo e os obtidos pelo software também a estudo estatístico (Teste de Hipótese de Wilcoxon). Os resultados morfométricos demonstraram que, em 7 dias, entre todos os grupos irrigados, o GO<sub>3</sub>< apresentou maior redução da área e que, no último período de observação, o GO<sub>3</sub>> apresentou contração da ferida mais regular, com diferenças estatisticamente significantes em comparação aos outros grupos. No período inicial de observação, a análise histomorfológica revelou que os GO<sub>3</sub>> e GO<sub>3</sub>< apresentaram expressão mais intensa do processo inflamatório, do que o grupo controle positivo, e demonstraram maior produção de matriz colagênica. No último período, em ambas análises histológicas, o GO<sub>3</sub>> e G<sub>nada</sub> apresentaram de forma mais expressiva as características histológicas do tecido de granulação em formação, como expressão mais intensa de síntese de colágeno e formação de matriz colagênica mais organizada. As análises imunohistoquímicas revelaram que a marcação do *colágeno tipo-I* foi regular para todos os grupos, e que os grupos irrigados com água ozonizada apresentaram maior número de miofibroblastos. Provavelmente a capacidade do ozônio em interferir em reações bioquímicas celulares, bem como a maior quantidade de oxigênio proveniente da água ozonizada, podem estar relacionados aos eventos observados à reparação tecidual, que podem ser interpretados como favoráveis dependendo da situação clínica. Os resultados desta pesquisa sugeriram atuação do ozônio diluído em água na reparação das lesões teciduais, de forma dependente da dose, com possível favorecimento ao fechamento tecidual e provável estímulos inflamatórios e reparadores que favoreceram a síntese de tecido, sem produzir efeito tóxico ou prejudicial.

Palavras-Chave: Ozônio, Reparação tecidual, Contração de ferida, Irrigações cirúrgicas

Traina AA. Biological effects of ozone in water on dermal wound healing in rats [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

## ABSTRACT

The ozone therapy has been described as an alternative treatment for many diseases due to its action on tissue healing. The purpose of this research was to analyze the biological effects of ozonized water, in two different concentrations, on tissue healing. Standard dermical wounds were made with a punch to excise a skin fragment with 5 millimeters diameter and depth, in the back of 48 rats. The animals were divided in four groups according to treatment: in one group the wounds were irrigated with ozonized water at 4ppm ( $GO_3>$ ), in other group the wounds were irrigated with ozonized water at 1ppm ( $GO_3<$ ), in the positive control the water was not ozonized ( $G_{water}$ ) and in the negative control the wound did not received any treatment ( $G_{noun}$ ). The irrigations were realized during ten minutes in the trans-operative time and daily, during five minutes, in the post-operative period. The animals were sacrificed on days 2, 7, and 14 following the procedure. At the time of sacrifice, the wounds were photographed to macroscopic assessment. The images were analyzed by morphometry software (ImageLab2000<sup>®</sup>) and the specimen were processed for microscopic, histomorfologic and histomorfometric (by the same software) analysis, and also for immunohistochemistry with antibody *collagen type-I* and *anti-actyn*. All data were submitted to quantitative analysis and the data got by the software were also submitted to statistic analysis (Wilcoxon Test). The

morphometric analysis demonstrated that, in 7 days, among all groups, the GO<sub>3</sub>< group showed a bigger area reduction, and in the last period (14 days), the GO<sub>3</sub>> group showed more regular wound contraction; with statistically significant differences in comparison with the others groups. In the last period, the GO<sub>3</sub>> group showed a better shape factor (relation between area and perimeter) with statically significant differences in comparison to others groups. In the initial period of observation (2 days), the histomorphologic analysis revealed that the GO<sub>3</sub>> and GO<sub>3</sub>< groups showed more intense expression of inflammatory process than the positive control group, and also demonstrated increased production of collagen matrix. In the last period, for both histologic analyses, the GO<sub>3</sub>> e G<sub>noun</sub> showed more evident features of healing process, as such more intense expression of fibrils collagen and collagen matrix synthesis. The immunohistochemistry studies revealed that the collagen type-I scoring was regular for all groups and that the irrigated groups with ozonized water showed a higher number of miofibroblasts. Probably, the ozone's capacity to interfere in biochemistry cellular reactions, as well the high oxygen quantity originated from ozonized water, may be related to tissue healing events, that may be favorable for some clinical situation. These results suggest that the ozonized water acts on tissue repair, in a dose dependent way, contributing to wound contraction and to tissue synthesis, without toxic effect.

Key-words: Ozone, Tissue healing, Wound contraction, Surgical irrigation

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Morfometria - representação da área da ferida.....	75
Gráfico 5.2 - Morfometria - representação do fator de forma.....	76
Gráfico 5.3 - Histomorfometria - representação da celularidade.....	83
Gráfico 5.4 - Histomorfometria – representação do espaço branco.....	83
Gráfico 5.5 - Histomorfometria – representação da matriz colagênica.....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Dados da análise morfológica com relação à porcentagem de perímetro, área e fator de forma.....	73
Tabela 5.2 - Dados da análise histomorfológica de acordo com escala arbitrária de expressão .....	77
Tabela 5.3 - Dados da análise histomorfométrica digital.....	82
Tabela 5.4 – Dados da análise da imunistoquímica para <i>colágeno tipo-I</i> de acordo com escala arbitrária de expressão de expressão.....	85

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Utilização do punch.....	61
Figura 4.2 - Excisão do tecido.....	61
Figura 4.3 - Delimitação do perímetro.....	66
Figura 4.4 - Cálculo da área.....	66
Figura 4.5 - Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 2 dias.....	69
Figura 4.6 - Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 7 dias.....	69
Figura 4.7 - Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 14 dias.....	69
Figura 5.1 - Fotografias das feridas de acordo com os grupos e períodos.....	74
Figura 5.2 - Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 2 dias.....	79
Figura 5.3 - Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 7 dias.....	80
Figura 5.4 - Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 15 dias.....	81
Figura 5.5 - Fotomicrografia dos cortes histológicos corados pela reação de imunistoquímica para anticorpo <i>colágeno tipo-I</i> de cada um dos grupos no período de 7 dias.....	87
Figura 5.6 - Fotomicrografia dos cortes corados pelas reações de imunistoquímica para anticorpo <i>colágeno tipo-I</i> de cada um dos grupos no período de 14 dias.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Solução salina fosfato-tamponada com albumina bovina
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	Fator de crescimento epitelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FOUSP	Faculdade de Odontologia de São Paulo
GO <sub>3</sub> >	Grupo que empregou água ozonizada na maior concentração
GO <sub>3</sub> <	Grupo que empregou água ozonizada na menor concentração
G <sub>água</sub>	Grupo que empregou água não ozonizada - controle positivo
G <sub>nada</sub>	Grupo que não recebeu irrigação - controle negativo
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleucinas
LIDO	Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia
NF $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
O	Átomo de Oxigênio
O <sub>3</sub>	Ozônio
O <sub>2</sub>	Oxigênio / dióxigênio
PDGF	Fator de crescimento derivado da plaqueta
pH	Potencial hidrogeniônica
POL	Produtos oxidativos lipídios
Redox	Reações de oxidação e redução

RNA	Ácido ribonucléico
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral- $\beta$
TRIS	Tri-hidroxil-metil-aminometano
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro
µg	Microgramas
dpi	Dots per Inch = Pontos por Polegada
Kg	Kilograma
L	Litro
m	Metro
m <sup>3</sup>	Metros cúbicos
min	Minuto
ml	Mililitro
mg	Miligramas
mm	Mililitros
MHz	Um milhão de Hertz
n°	Número
ppm	Partes por milhão (=mg/L)
X	Vezes
%	Por cento
+/-	Desvio Padrão
π	pi = 3,14...

# SUMÁRIO

	<b>p.</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
<b>2.1 Histórico da ozonioterapia</b> .....	21
2.2 Biofísica do ozônio .....	24
2.3 Bioquímica do ozônio .....	27
2.4 Formas de administrações da ozonioterapia .....	45
2.5 Indicações da ozonioterapia .....	46
2.6 Aplicações da ozonioterapia na odontologia .....	50
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	59
<b>4 MATERIAL E METODOS</b> .....	60
<b>4.1 Amostra experimental</b> .....	60
<b>4.2 Procedimentos realizados</b> .....	60
<b>4.3 Produção da água ozonizada</b> .....	63
<b>4.4 Análise das lesões induzidas</b> .....	65
4.4.1 Avaliação macroscópica – Análise morfométrica .....	65
4.4.2 Avaliação microscópica .....	67
4.4.2.1 <i>análise histomorfológica</i> .....	67
4.4.2.2 <i>análise histomorfométrica</i> .....	67
4.4.2.3 <i>análise imunoistoquímica</i> .....	70
<b>5 RESULTADOS</b> .....	73
<b>5.1 Avaliação macroscópica – morfométrica</b> .....	73

<b>5.2 Avaliação microscópica</b> .....	77
5.2.1 Análise histomorfológica .....	77
5.2.2 Análise histomorfométrica .....	82
5.2.3 Análise imunoistoquímica .....	85
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	89
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	105
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	106
<b>ANEXOS</b> .....	117

# 1 INTRODUÇÃO

A reparação tecidual é considerada um fenômeno complexo que envolve uma seqüência análoga de estágios bioquímicos celulares modulados por reações de oxidação e redução de um organismo (SEN et al. 2002; SEN; ROY, 2008). Enfatiza-se que a mesma é essencial para qualquer processo de recuperação frente a um traumatismo ou a uma doença.

Atualmente, a ozonioterapia tem sido explorada como uma alternativa terapêutica no tratamento de muitas doenças agudas e crônicas, por ser capaz de intervir no equilíbrio de oxido-redução. O ozônio, sendo um potente oxidante, quando em contato com fluidos orgânicos acarreta na formação de moléculas reativas de oxigênio, que influenciam eventos bioquímicos do metabolismo celular, o que pode proporcionar benefícios à reparação tecidual, além do efeito antimicrobiano.

Há inúmeras possibilidades de indicação para o uso terapêutico do ozônio, já com bons indícios comprovados para o tratamento de algumas situações clínicas. Além disso, várias vantagens desta terapia são referidas na literatura, por exemplo, potente ação antimicrobiana, fácil aplicação sistêmica ou local, baixo custo, ausência de efeito adverso, intolerância ou contra-indicação (BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; BOCCI, 2006c; MARTÍNEZ-SANCHES et al., 2005).

Até o momento, há muita atenção e debate com relação à dose terapêutica adequada, pois, se o ozônio for empregado em concentrações impróprias, pode ser inútil ou tóxico, o que torna muitas vezes sua aplicação controversa e questionada na literatura. Adicionalmente, apesar do crescente número de publicações a respeito

do emprego terapêutico do ozônio ainda há um relativo empirismo quanto aos conhecimentos teóricos e clínicos. Desta forma, a ozonioterapia se revela um campo aberto para pesquisa sobre sua efetividade e seu desempenho biológico que certifique o controle das suas ações terapêuticas.

Uma perspectiva de uso fácil e seguro é a aplicação local do ozônio diluído em água. A água ozonizada pode ser capaz de beneficiar a reparação tecidual e apresentar diversas indicações na área da odontologia.

Neste contexto, propusemo-nos a pesquisar os efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas dérmicas induzidas em animais, como uma etapa inicial importante para subsídio científico que fundamente seu possível uso clínico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico da ozonioterapia

Em 1840, Christian Friedrich Schönbiem descobriu uma variante mais alotrópica e mais ativa do que o oxigênio ( $O_2$ ): o ozônio ( $O_3$ ) (GROOTVELT et al., 2004a; VERANES et al., 1998; VERANES et al., 1999). Este gás foi primeiramente mensurado em 1853 em montanhas australianas (VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005).

O primeiro gerador de ozônio foi desenvolvido por Werner von Siemens, na Alemanha por volta de 1854, e o primeiro relato do seu uso terapêutico foi feito por C. Lender em 1870, com o propósito de purificar o sangue (GROOTVELT et al., 2004b).

Desde a Primeira Guerra Mundial, a aplicação tópica do ozônio é reportada para o tratamento de feridas infectadas devido suas propriedades antimicrobianas (CARDOSO et al., 2000; GROOTVELT et al., 2004a).

Em 1974, Wolf publicou um método de auto-hemoterapia com ozônio, no qual o sangue humano era retirado do paciente, exposto a uma mistura de ozônio e oxigênio durante poucos minutos em vidros adequados, e reinfundido no paciente doador. Desde então, este método tem sido utilizado com finalidades terapêuticas (TRAVAGLI; ZANARDI; BOCCI, 2006).

Na odontologia, por volta de 1933, o ozônio foi utilizado para o tratamento de

cáries e infecções periodontais crônicas por E. A. Fisch<sup>1</sup> (1934, apud STÜNGER; SABER; FILIPPI, 2006). A utilização terapêutica em cirurgias bucais é referendada a outro cirurgião alemão Dr. Erwin Payr, com dados reportados em um congresso alemão de cirurgia, em 1935, sem publicação indexada. A literatura disserta que nesta época a água ozonizada foi utilizada nas cirurgias para promover hemostasia, melhorar oxigenação local e inibir a proliferação bacteriana (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2008).

De acordo com Bocci (2004a), Buliés et al. (1997) e Grootvelt et al. (2004b), o ozônio é um gás que alimenta controvérsias porque, ao mesmo tempo em que apresenta grande possibilidade de utilização terapêutica, é um gás altamente tóxico por via respiratória, embora seja útil na estratosfera para a absorção da radiação de raios ultravioleta, **B** e **C**. O sistema broncopulmonar, olhos e a pele são os órgãos mais vulneráveis ao ozônio na atmosfera. Os efeitos tóxicos locais e sistêmicos deste gás no sistema pulmonar, quando respirados, incluem hiperatividade das vias aéreas, aumento da permeabilidade macromolecular epitelial, infiltração de neutrófilos e hipersecreção de muco (PRYOR; SQUADRITO; FRIEDMAN, 1995).

Bocci (2006b) relatou alguns argumentos que poderiam coligar à proibição do uso do ozônio na medicina: é um gás tóxico que não deve ser respirado; muitas doenças são perpetuadas por um estresse oxidativo crônico, nas quais um gás gerador de radicais livres (oxidantes) não deveria ser utilizado; e sua aplicação intravenosa incorreta tem grande risco de embolia pulmonar e morte (procedimento proibido na Alemanha deste 1984).

Para Bocci (2004a, 2006b, 2006c, 2008) e Re et al. (2008), durante muito tempo, a ozonioterapia foi utilizada de forma empírica por profissionais não

---

<sup>1</sup> Fisch EA. Die ozontherapie in der Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde [thesis]. Bonn, Germany: Rheinische Friedrich Wilhems Universität; 1934.

adequadamente qualificados, criando um ceticismo com relação aos seus efeitos. Esses fatos, juntamente com a falta de precisão dos geradores de ozônio, a dificuldade em se estabelecer a dose terapêutica adequada, o charlatanismo das empresas, a falta de interesse das autoridades governamentais para regulamentar seu uso, o pouco suporte financeiro para pesquisas científicas, a inexistência de veemência por parte da indústria farmacêutica por não ser um produto patenteável, a escassez de pesquisas controladas que estabelecesse sua real eficiência clínica e sua toxicidade, ao lado da existência de trabalhos com metodologias inadequadas, têm mantido a ozonioterapia questionável na medicina e tem impedindo sua maior utilização.

Inúmeros estudos têm investigado a ação do ozônio para tentar elucidar os efeitos tóxicos decorrentes da sua exposição e para estabelecer a dose terapêutica correta (BOCCI, 2006b, 2006c; CARDOSO et al., 2000; VALACCHI et al., 2002, 2003, 2004; VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005). Atualmente, segundo Re et al. (2008), a literatura sobre o tema vem sendo ampliada, ainda com incertezas sobre seu potencial tóxico e sua eficiência clínica. Bocci (2007, 2008) e Larini e Bocci (2005) afirmaram que a toxicidade do ozônio é hoje bem conhecida e controlável, e que, após décadas de estudos clínicos e experimentais, este gás é considerado, em concentrações apropriadas, terapêutico, seguro e não tóxico, e deveria ser integrado à medicina convencional.

A ozonioterapia não é oficializada em muitos países, onde serviços privados têm utilizado-a vastamente (HERNÁNDEZ, 2007). Seu emprego é freqüente em países subdesenvolvidos, onde os geradores de ozônio não têm acompanhamento técnico adequado e faltam recursos para pesquisa dos conhecimentos básicos sobre suas ações biológicas. Países como Alemanha e Itália, com experiência do uso do

ozônio principalmente em hérnia de disco, tem pouquíssimos trabalhos científicos. A Inglaterra, França e Estados Unidos dificilmente utilizam a ozonioterapia, principalmente devido ao pouco estímulo das autoridades em saúde e da indústria farmacêutica que não tem interesse comercial nesta terapia (BOCCI, 2007). Nações emergentes como China, Índia e México estão investindo no uso do ozônio, especialmente para tratamento de doenças vasculares e ortopédicas (BOCCI, 2008).

De acordo com Al-Dalain et al. (2001), o ozônio vem sendo utilizado como agente terapêutico pela observação clínica dos seus efeitos benéficos, sendo que seus mecanismos bioquímicos e farmacológicos precisam ser melhores elucidados, necessitando de mais pesquisas científicas.

Nas últimas quatro décadas, a ozonioterapia tem sido estudada cientificamente, tanto com relação a seus conceitos básicos como a seus efeitos clínicos, o que tem permitido que na atualidade haja um melhor conhecimento de sua ação biológica (BOCCI, 2004a, 2008), ampliando sua utilização na Europa e em alguns países, como Austrália, Israel, Cuba, Brasil e Colômbia (GROOTVELT et al., 2004a). Segundo Stübinger, Saber e Filippi (2006), o uso desta terapia ainda é insipiente em cirurgia buco-maxilo-facial.

## **2.2 Biofísica do ozônio**

O ozônio é formado por uma molécula tri-atômica do átomo de oxigênio (O) de estrutura cíclica. Dependendo de uma série de condições, como temperatura e pressão, o O<sub>3</sub> pode se decompor rapidamente em moléculas de átomos puros de

oxigênio, dióxigênio ( $O_2$ ) e em potentes oxidantes (STÜBINGER; SABER; FILIPPI, 2006).

Em temperatura ambiente, é um gás azul de odor característico que pode ser notado em concentrações acima de 2ppm (STÜBINGER; SABER; FILIPPI, 2006). Em condições normais, a concentração do ozônio no ar atmosférico gira em torno de 0,1ppm e, em condições de muita poluição (dias quentes em cidades industriais), pode exceder 0,8ppm (VALACCHI et al., 2002, 2003, 2004).

A molécula do ozônio é a terceira oxidante mais potente, após o fluoreto e persulfato. Em relação ao oxigênio ( $O_2$ ), tem um maior poder oxidante, uma ação mais seletiva sobre os componentes orgânicos, é muito mais instável, é 1,6 mais denso e é 10 vezes mais solúvel na água (BOCCI, 2004a; BULIÉS et al., 1997).

Atualmente, há vários tipos de geradores de ozônio com o propósito de aplicações clínicas (GROOTVELT et al., 2004a). Através de um gradiente de alta voltagem, esses geradores produzem o  $O_3$  a partir da passagem e fotodissociação do dióxigênio em átomos de oxigênio ( $O_2 \rightarrow 2O$ ), que reagem com outras moléculas de dióxigênio, formando o ozônio ( $O_2 + O \rightarrow O_3$ ). Para esta produção, deve-se empregar oxigênio puro porque na presença do ar atmosférico, outros compostos, como dióxido de nitrogênio, também serão formados. É essencial que os geradores sejam produzidos com alta qualidade e com materiais resistentes ao ozônio, como o aço inoxidável, o vidro e o Teflon<sup>®</sup> (BOCCI, 2004a, 2006b).

Segundo Filippi (1998), o ozônio liberado no ar durante sua produção por geradores e durante a produção da água ozonizada não atinge concentração atmosférica que represente riscos ou contra-indicações para sua utilização.

Como o ozônio é uma molécula instável, esse se decompõe facilmente em oxigênio por reação exotérmica (GROOTVELT et al., 2004a), apresentando meia

vida de quarenta minutos a 20-25°C, não podendo ser armazenado, devendo ser rapidamente utilizado (BOCCI, 2004a, b; BULIÉS et al., 1997).

O ozônio dissolve-se fisicamente em água pura, dependendo da temperatura, pressão e concentração do gás. Nesta situação sua instabilidade de modifica, sendo que parte das moléculas se decompõe em segundos e parte permanece estável por horas (STÜBINGER; SABER; FILIPPI, 2006). Assim, a meia-vida da porção estável gira em torno de 10 horas (em um pH=7 e a 20°C), podendo permanecer na água por alguns dias se armazenado em recipiente de vidro rigorosamente fechado (BOCCI, 2004a, b, 2006c; BULIÉS et al., 1997).

O ozônio pode ser misturado com óleos, por meio de descargas elétricas, como o de girassol que possui alta afinidade por ser rico em ácidos insaturados. Quando ozonizados esses ácidos formam ozonídeos e, da hidrólise destes, podem ser gerados aldeídos, cetonas e peróxidos de hidrogênio, que são responsáveis pelo desencadeamento das reações bioquímicas (LINCHETA et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2000).

Após a formação do ozônio, este reage com qualquer doador de elétron que sofre oxidação, gerando o  $O_3^-$  (anion radical), que se decompõe em radical hidroxila, formando também molécula de dióxigênio. Dessa forma, esta reação torna o ozônio um oxidante potente que pode agir como precursor de uma série de radicais, com ações tanto *in vitro* como *in vivo* (GROOTVELT et al., 2004a).

### 2.3 Bioquímica do ozônio

Quando em contato com fluidos orgânicos (saliva, plasma, urina e linfa), o ozônio reage imediatamente ( $O_3 + \text{biomoléculas} = O_2 + O^-$ ), deixando de existir. Em ordem de preferência, o ozônio reage com ácidos gordurosos poliinsaturados, antioxidantes (como ácido ascórbico e úrico) e compostos tiol com grupo  $-SH$  (como cisteína, glutadiona e albumina). Dependendo da concentração do ozônio, carboidratos, enzimas, DNA e RNA também podem interagir. Todos esses reagentes funcionam como elétrons doadores e sofrem oxidação, e as reações que ocorrem formam simultaneamente moléculas de espécies reativas de oxigênio (ERO) e produtos oxidantes lipídios (POL). Essas moléculas são responsáveis pelas reações bioquímicas induzidas pelo ozônio (BOCCI, 2004a, 2006c, 2007).

A formação das ERO é extremamente rápida e, depois de formadas, agem e desaparecem imediatamente por serem moléculas instáveis, com meia vida menor que um segundo. Mesmo com esta curta duração, são capazes de interagir com componentes celulares desencadeando efeitos biológicos terapêuticos ou prejudiciais, dependendo da concentração (BOCCI, 2004a, 2006c).

Os POL são moléculas menores, mais estáveis e de maior difusão que as ERO, podendo ser mais tóxicas, dependendo da concentração. Devido a esta estabilidade, os POL distribuem-se facilmente entre os tecidos e são diluídos pelos fluidos corporais. Sua excreção ocorre via urinária e bile e sua metabolização é regulada principalmente por glutadiona-transferase e aldeídos desidrogenases. Apenas concentração micromolar alcança todos os órgãos (particularmente o osso medular, fígado, sistema nervoso central e glândulas endócrinas). Esta

farmacodinâmica permite minimizar o potencial tóxico destas moléculas e permite que se tornem mensageiros tardios de longa distância (BOCCI, 2006a, c).

As ERO têm emergindo como importantes moléculas sinalizadoras na regulação de vários processos celulares, e incluem todas as moléculas quimicamente reativas derivadas da molécula de oxigênio, geradas por fontes endógenas e exógenas (calor, raios ultravioletas, fármacos terapêuticos, radiação ionizante e poluentes). Todas as células vivas, como linfócitos, neutrófilos, monócitos, plaquetas, fibroblastos e osteoclastos, podem gerar estas moléculas durante seu metabolismo normal. Quando em excesso, as ERO resultam em alteração do metabolismo das células responsáveis pela síntese da matriz extracelular, e em prejuízo a todos os constituintes celulares e aos componentes extracelulares, podendo induzir a morte celular por apoptose e necrose. Como as ERO são altamente reativas, produzem principalmente alteração no local da sua geração (ÇANAKÇI; ÇICEK; ÇANAKÇI, 2005).

Segundo Bocci (2006c), o conceito de que as ERO e os POL são sempre lesivos tem sido revisto, porque estes em quantidade fisiológica podem agir como reguladores bioquímicos.

As reações com as ERO podem gerar a formação de átomos de oxigênio, dióxigênio, superóxido aniônico, radical hidroxila, monóxido de nitrogênio, peroxinitrato e hipoclorito aniônico. A produção dos POL segue a peroxidação dos ácidos gordurosos poliinsaturados presentes no plasma. Estes produtos são heterogêneos e podem ser classificados como lipoperoxidase, radicais alcóxila, lipohidroperóxido, entre outros (BOCCI, 2004a, 2006c).

Entre as ERO, o peróxido de hidrogênio é a espécie principal. Esta molécula é uma oxidante capaz de agir como um mensageiro do ozônio e provocar uma série

de efeitos celulares. Após sua formação, esse peróxido difunde-se facilmente para dentro da célula, sendo capaz de ativar simultaneamente diferentes caminhos bioquímicos (BOCCI, 2006c).

O peróxido de hidrogênio gerado pelo ozônio é uma das mais importantes moléculas sinalizadoras intracelulares que interage com diferentes células do sangue: nos eritrócitos podem alterar a glicólise, aumentando a formação de energia e o transporte de oxigênio para o interior dos tecidos; nos neutrófilos e leucócitos podem ativar e estimular a síntese de citocina e interleucinas, favorecendo uma possível re-ativação fisiológica do sistema imunológico deprimido; nas plaquetas pode proporcionar aumento da atividade destas, e, como consequência, aumento da liberação de autacóides e fatores de crescimento, o que pode favorecer a reparação de feridas teciduais (BOCCI, 2004a, 2006c).

Em baixas concentrações, as reações com os POL podem ser estimuladoras e benéficas, por gerarem processos oxidativos agudos que funcionam como sinalizadores ao organismo de outros estresses oxidativos existentes. Este fato estimula mecanismos antioxidantes, como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutadiona-peroxidase, glutadiona-reductase, catalase e heme-oxigenase-I. Devido às ações dessas enzimas, as células da medula óssea podem aumentar a liberação de células tronco (favorecendo a reconstituição de tecidos) e as células endoteliais podem aumentar a produção de vários compostos, como do óxido nítrico que atua na angiogênese. Aquela sinalização, também deve acarretar na estimulação no sistema endócrino e nervoso central, o que ajuda a compreender o porquê de alguns pacientes relatarem euforia e bem estar durante o tratamento, provavelmente devido à melhora do metabolismo bem como estímulo hormonal e liberação de neurotransmissor (BOCCI, 2004a, 2006c, 2008).

Segundo Madej et al. (2007), a principal forma de proteção do corpo contra radicais livres durante um processo séptico envolve mecanismos enzimáticos, como a atividade da dismutase superoxide, catalase e glutadiona-peroxidase. Os autores comprovaram em estudo experimental que a ozonioterapia promoveu aumento da atividade dessas enzimas, fato com significância clínica que representa forte indício do efeito estabilizador e regenerador da ozonioterapia.

O termo estresse oxidativo é conceituado como a prevalência de espécies oxidativas dentro da célula que suscitam atividades sobre as defesas antioxidantes da mesma. O papel dessas complexas reações de oxidação e redução (redox) na regularização de mecanismos moleculares pode ter atuação terapêutica ou prejudicial (HERNÁNDEZ, 2007). Este estresse oxidativo é parcialmente ou totalmente a causa de muitas doenças, como câncer, aterosclerose, catarata, maculopatia, Alzheimer e Parkinson. Em outras doenças, como diabetes, insuficiência renal crônica e processos infecciosos, cria-se secundariamente uma superprodução de ERO, o que piora a evolução das mesmas (BOCCI, 2006a; HERNÁNDEZ, 2007).

Em dose segura e correta, o ozônio representa um estresse oxidativo agudo não deletério que induz uma reposta celular antioxidante capaz de reverter um estresse oxidativo crônico existente, ou seja, ajuda a normalizar o balanço redox alterado em várias doenças. Essa atuação pode melhorar a circulação (vasodilatação local e angiogênese) e o suporte de oxigênio, favorecer o metabolismo e a liberação de citocinas, autacóides e fatores de crescimento, que, juntamente com a atividade antimicrobiana, representam elementos cruciais no tratamento de doenças metabólicas, inflamatórias, infecciosas ou neoplásicas (BOCCI, 1996, 2006c). Para Bocci (2006c), a ação da ozonioterapia pode ser

interpretada como um “choque terapêutico” atóxico, capaz de restaurar a homeostasia por ser um modificador da resposta fisiológica.

Segundo Re et al. (2008), o ozônio em baixas doses é capaz de promover uma pré-condição oxidativa por meio do aumento e preservação de sistemas endógenos antioxidante. Os autores encontraram evidências que este gás promove a regularização da concentração endógena de óxido nítrico e mantém um adequado balanço redox. Os mesmos autores relataram que o conceito farmacológico de uma droga, no qual há uma interação droga-receptor para promover uma atividade na função celular, parece não se aplicar ao ozônio, o que acontece também com outros tipos de gases, pois induzem atividade farmacológica sem aquela interação droga-receptor. O ozônio pode ser considerado uma pró-droga, a qual, em doses não tóxicas, pode induzir uma reorganização dos mecanismos bioquímicos com atividade de segundo mensageiro na cascata de múltiplas ações.

De acordo com Bocci (1996), a ozonioterapia, tanto aplicada de forma local como sistêmica, pode acelerar a reparação tecidual devido ao fato do ozônio interagir em diferentes componentes celulares, como em eritrócitos, leucócitos, plaquetas e células endoteliais.

A reparação tecidual consiste em eventos progressivos e ordenados, caracterizada por várias fases concomitantes reguladas por eventos biológicos específicos, que se iniciam no momento do trauma e permanecem por períodos variados (GREGORI et al., 2004; SHAFER; MINE; LEVY, 1987).

Todas as fases da reparação são coordenadas por citocinas e fatores de crescimento específicos. Por exemplo, na inflamação, atuam prostaglandinas, interleucinas (IL) e óxido nítrico; na re-epitelização, o fator de crescimento epitelial (EGF); na angiogênese, o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de

crescimento endotelial vascular (VEGF); e na migração e proliferação dos fibroblastos, deposição e remodelação da matriz extracelular (colágeno tipo I, II e III), o fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), o FGF, fator de crescimento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-1 e IL-4 (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; KWON et al., 2006).

A formação da matriz extracelular depende não apenas da síntese de fibras colágenas e de outros componentes da matriz, como também da degradação deste colágeno, o que é regulado principalmente pelas metaloproteinases, cuja secreção é influenciada por inúmeros estímulos, incluindo fatores de crescimento (PDGF e FGF) e citocinas, IL-1 e fator de necrose tumoral – TNF- $\alpha$ ). Inicialmente são depositados colágenos tipo III que depois são remodelados para tipo I, conferindo a remodelação e tensão ao tecido neoformado (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; KWON et al., 2006).

Os miofibroblastos são essenciais para síntese, remodelação e contração do tecido conjuntivo durante o processo de reparação normal ou patológico. A proliferação, diferenciação e apoptose dessas células envolvem uma seqüência de fenômenos complexos, regulados por combinações de sinais moleculares (GROTENDORST; RAHMANIE; DUNCAN, 2004; HINZ et al., 2007; MOULIN et al., 2004; TOMASEK et al., 2002). Normalmente, essas células aparecem no meio do processo de reparação e são responsáveis por forças de contração para o fechamento da ferida e desaparecem nos estágios mais avançados (KWON et al., 2006).

Em condições normais, os fibroblastos não exibem atividade de contração e produzem pouca matriz extracelular. Frente ao dano tecidual, essas células, entre outras, são recrutadas a migrarem para o tecido danificado e proliferarem-se, sendo

ativadas por citocinas liberadas pela própria inflamação ou por células residentes. Os fibroblastos passam a adquirir fibras contrácteis, surgindo os proto-miofibroblastos, sendo importante, para este fato, a atuação do PDGF. A diferenciação deste proto-miofibroblastos para miofibroblastos, que tem capacidade de sintetizar e remodelar grandes quantidades de matriz extracelular, é caracterizada por nova expressão de  $\alpha$ -actina músculo liso e aumento da expressão de fibronectina, que é regulada principalmente pelo TGF- $\beta$ . No final do processo de reparação, os miofibroblastos desaparecem por apoptose, induzida principalmente pelo óxido nítrico (GROTENDORST; RAHMANIE; DUNCAN, 2004; HINZ et al., 2007; TOMASEK et al., 2002).

Feugate, Li e Martins-Green (2002) identificaram que o aumento de citocinas atuantes na diferenciação dos miofibroblastos está correlacionado com a maior expressão de miofibroblastos e aceleração do fechamento da ferida ou formação de cicatriz.

Kandler et al. (2005) enfatizaram que em todo processo de reparação, inclusive no tecido ósseo e em doenças sistêmicas, há necessidade de um equilíbrio entre a produção de ERO e sua neutralização para se evitar toxicidade. Exemplificaram a neutralização dos peróxidos de hidrogênio realizada pelas plaquetas, protegendo o tecido de granulação durante a remodelação óssea.

Durante a inflamação, que é a primeira reposta reparadora fundamental para a proteção do organismo e surgimento do novo tecido, na qual ocorre infiltração de neutrófilos e macrófagos no local da ferida, oxidantes são produzidos. Entre esse, encontra-se as ERO, que podem promover ou desfavorecer a reparação tecidual. Como exemplo, pode ser citado o peróxido de hidrogênio liberado fisiologicamente por neutrófilos (SEN et al., 2002).

O exato mecanismo pelo qual o peróxido de hidrogênio interfere na reparação ainda não é bem conhecido. Este pode favorecer a reparação pela sua ação bactericida direta e pela sua capacidade de estimular a liberação de fatores de crescimento (como VEGF-4 e TGF- $\beta$ 1) e de induzir a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno. Por outro lado, este mesmo oxidante pode provocar efeitos negativos, como citotoxicidade, inibição da migração de queratócitos e apoptose celular, favorecendo a formação de cicatriz (WASSERBACER; PEREZ-MEZA; CHAO, 2008; WILGUS et al., 2005).

Sen et al. (2002) demonstraram que os peróxidos de hidrogênio não apenas induzem a expressão de VEGF nos macrófagos e queratinócitos, atuando na angiogênese, como também estimulam a produção de colágeno. Esses resultados, segundo os autores, comprovaram que a reparação tecidual está sujeita ao controle redox.

De acordo com Wilgus et al. (2005), o potencial do peróxido de hidrogênio em induzir proliferação de fibroblastos pode ter efeito positivo em feridas crônicas, ao contrário de feridas cirúrgicas limpas em pacientes sistemicamente normais sem risco de infecção, nos quais aquele oxidante poderia afetar esteticamente e funcionalmente com a produção de cicatriz.

A hipoxia tecidual, causada por vasculopatia periférica ou interrupção vascular, representa uma importante limitação para a reparação tecidual. Fatores que podem aumentar o suplemento de oxigênio neste tecido, como a câmara hiperbárica, podem favorecer e acelerar a reparação. Fries et al. (2005) verificaram que a aplicação tópica de oxigênio sobre feridas dérmicas experimentais aumentou a quantidade de oxigênio disponível no tecido superficial, acelerando clinicamente o

fechamento da mesma e favorecendo histologicamente a angiogênese, sem feito tóxico.

Sen e Roy (2008) lembraram que atualmente sabe-se que o oxigênio, além de favorecer a desinfecção e gerar energia, são também sinalizadores de eventos oxigênio-dependente, sensíveis ao redox, representando um componente fundamental para todos os fatores relacionados à reparação tecidual. Todos os aspectos desta reparação (hemostasia, inflamação, re-epitelização, vascularização e a atuação do óxido nítrico) são sensíveis ao balanço redox. O entendimento da geração e da atuação das ERO na reparação é de fundamental importância para a pesquisa de novos tratamentos. Terapias que atuam no balanço redox podem ser de grande utilidade para a reparação de feridas crônicas, lembrando os autores que devem ser analisadas e aplicadas com cautela, por serem capazes também de apresentarem potencial para desfavorecer a reparação e remodelação tecidual se utilizadas em concentrações inadequadas.

O trabalho experimental de Cardoso et al. (2000) verificou que a administração oral de água ozonizada (concentração de  $0,6\mu\text{g ml}^{-1}$ , verificada com método colorimétrico) pôde diminuir a ocorrência e a gravidade de úlceras gástricas induzidas e pôde atenuar o edema de lesões dérmicas induzidas. Baseados nos resultados, os autores sugerem que a água ozonizada participa como modulador específico do processo inflamatório por indução gradual do estresse oxidativo.

Segundo Gracer e Bocci (2005), a aplicação local do ozônio em tecido inflamado pode favorecer a normalização metabólica, a proliferação celular e a síntese de matriz extracelular, sendo que aumenta a quantidade de leucócitos locais e a liberação de fatores de crescimento pelos eritrócitos e plaquetas para a construção da matriz extracelular e reconstrução tecidual, induzindo síntese de

proteínas, particularmente a heme-oxigenase I. A heme-oxigenase tem sido descrita na literatura como uma das defesas enzimáticas antioxidantes mais importantes que, depois de ser quebrada em heme molécula, parteja muitos componentes úteis como o monóxido de carbono e bilirrubina, facilitando a circulação local e neutralizando compostos oxidantes. A bilirrubina é um importante antioxidante lipolítico e, em sinal com aquele monóxido, coopera com o óxido nítrico, regulando a vasodilatação (BOCCI, 2004a, 2006c).

Pesquisando *in vitro* a toxidade da exposição ao ozônio a linhagens de células humanas monocítica, Foucaud et al. (2006) verificaram que esta provocou aumento na peroxidação lipídica e na expressão da heme-oxigenase I, bem como modificações no estado redox e na atividade enzimática antioxidante. Algumas dessas mudanças na expressão de marcadores oxidativos puderam persistir por um tempo prolongado, sugerindo que o ozônio pode modificar a função celular por um período longo após sua aplicação.

Foi demonstrado *in vitro* por Valacchi e Bocci (1999), que fatores de crescimento, como o PDGF, TGF- $\beta$ 1 e interleucinas, foram aumentados de modo dose-dependente, após a ozonização de amostras plasmáticas ricas em plaquetas. Esses fatores são essenciais para a reparação tecidual. O aumento tardio da IL-8 permite a saída dos leucócitos da circulação para os tecidos, o que pode exercer uma função adicional, favorecendo a fagocitoses de bactérias e de tecido necrótico presente em úlceras e feridas. Esses fatos ajudam, segundo os autores, a explicar o porquê da melhora na reparação tecidual de úlceras crônicas em pacientes tratados com ozonioterapia sistêmica.

A proposição do estudo de Larini e Bocci (2005) foi de esclarecer se células mononucleares do sangue periféricas isoladas, oriundas de 12 doadores saudáveis

de sangue, quando expostas há 10 minutos ao ozônio em diversas concentrações, modificariam seu padrão de proliferação e de produção de citocinas. Nas condições experimentais, apenas baixas concentrações de ozônio (1,0µg/ml e 20µg/ml de gás por ml de suspensão de célula) tiveram efeito estimulador na proliferação celular e na produção de interleucinas, principalmente interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  e IL-10. Atualmente é bem conhecido que a bioquímica para a produção das citocinas é modulada por antioxidantes, como glutadiona, ácido ascórbico, glutadiona-peroxidase e catalase. Os autores lembraram que sempre há diferença na resposta entre os organismos, havendo muita ou pouca resposta, a qualquer terapia, fato evidenciado pelos resultados de três doadores de sangue que não se comportaram como os demais neste estudo. Esta dis-homogeneidade na produção de citocinas deve ser lembrada, de acordo com os autores, porque na prática pacientes imunodeprimidos podem não ser responsivo a ozonioterapia.

Os autores Schulz e Stechmiller (2006) lembraram que a malnutrição, a diabetes e que a utilização de esteróides acarretam na menor expressão do óxido nítrico, ao contrário das feridas infectadas e inflamações crônicas, fatos que prejudicam a reparação. Desta forma, terapias para regular a síntese do óxido nítrico pode ser uma nova opção de tratamento para aquelas situações, principalmente quando há inflamação crônica que se comporta diferente da aguda, devido ao desequilíbrio entre as moléculas reguladoras do processo de inflamação.

Shi et al. (2001) identificaram que deficiência de óxido nítrico prejudicou a reparação tecidual, sugerindo que este óxido tem um importante papel na síntese do colágeno, sendo regulador da função dos fibroblastos. Os autores lembraram que o excesso deste óxido, bem como sua falta, prejudica a reparação, pois este atua na

vascularização, angiogênese, inflamação e resposta imune do processo de reparação.

O prejuízo tecidual em doenças inflamatórias, como na doença periodontal, pode ser provocado pelas ERO produzidos fisiologicamente pelos neutrófilos. Dessa forma, o óxido nítrico produzido nestes casos pode induzir a apoptose de muitas células, inclusive dos fibroblastos, contribuindo para a destruição tecidual (ÇANAKÇI; ÇICEK; ÇANAKÇI, 2005).

De acordo com Chen et al. (2008a, b), o emprego da ozonioterapia tem sido fortemente relacionado ao aumento da expressão de óxido nítrico. Os autores observaram experimentalmente efeitos benéficos com esta terapia aplicada previamente a transplantes de rim, atribuídos ao seu provável efeito protetor ao dano tecidual, que acontece em decorrência do processo inflamatório, da isquemia e da apoptose nestes casos.

Re et al. (2008) enfatizaram que o papel deste óxido é dúbio, porque pode aumentar o suporte sanguíneo em região isquêmica, diminuindo o prejuízo tecidual nessas regiões, como pode também induzir a citotoxicidade celular e destruição tecidual via peroxidação lipídica, dependendo da sua concentração, local de liberação e duração da ação. Normalmente, em baixos níveis apresentam ação protetora e em altos, ação prejudicial.

Para Batista et al. (2001) e Veranes et al. (1999), as reações desencadeadas pelo ozônio podem refletir em: melhoramento do fluxo sanguíneo e da circulação de oxigênio; aumento da capacidade de absorção do oxigênio pelos eritrócitos e assim ampliação da transferência destes para os tecidos; estímulo do processo de metabolização do oxigênio; ativação do sistema de defesa antioxidante; e ações bactericidas, fungicidas e virulicidas.

Com relação à ação antimicrobiana, o ozônio tem um forte efeito desinfetante com amplo espectro de ação, por ser um potente oxidante que age na formação de radicais livres. O gás não atua da mesma forma para todos os microorganismos, sendo que alguns são mais sensíveis que outros. Sua ação antimicrobiana atua diretamente na destruição dos microorganismos, e pode ser atribuída à inibição da atividade metabólica, à mudança na cápsula, à destruição irreversível do DNA viral e à produção de anticorpos ozônios-produzidos (STÜBINGER; SABER; FILIPPI, 2006).

A destruição da bactéria pelo ozônio pode ser realizada de duas maneiras: reações desencadeadas direta ou indiretamente (HEMS et al., 2005). Quando os microorganismos (bactérias, vírus e fungos) estão dentro das células, são protegidos por um potente sistema antioxidante destas, sendo que a ação antimicrobiana do ozônio ocorre por estimulação do sistema imunológico desencadeada por este composto (BOCCI, 2006c).

Segundo Buliés (1996) e Buliés et al. (1997), o ozônio produz oxidação letal no protoplasma bacteriano, por produzir alteração dos ácidos gordurosos insaturados da parede bacteriana, tornando-se microbicida, bactericida, fungicida e parasiticida. Segundo os mesmos autores, o ozônio possui ação antiinflamatória e analgésica, com alívio de forma duradoura da sintomatologia dolorosa, por regular o metabolismo celular, os mecanismos oxidativos celulares, por favorecer a oxigenação tecidual e por ser imunomodulador. O aumento de oxigênio nos tecidos seria em decorrência das reações de oxidação com os ácidos gordurosos insaturados da membrana fosfolipídica, que geram peróxidos hidrofílicos estimulando a formação de substâncias desoxigenantes, as quais atuarão sobre a oxi-hemoglobina liberando oxigênio.

Segundo Wentorth et al. (2002), o ozônio pode estimular mecanismos de defesa e alterar o funcionamento das citocinas, pois uma molécula do ozônio é gerada fisiologicamente pelos neutrófilos do sistema imunológico. No estudo *in vivo* experimental desenvolvido por estes autores, ficou demonstrado a presença fisiológica de um oxidante com características químicas similares à molécula de ozônio durante o processo de inflamação, cuja molécula foi gerada durante a morte bacteriana pelos anticorpos da superfície dos neutrófilos ativados, juntamente com outros potentes oxidantes, incluindo o oxigênio, que é um substrato para o processo de oxidação para ativação de anticorpo. De acordo com os mesmos autores, essas propriedades fazem do ozônio uma molécula efetora ideal por poder estar localizado no local da inflamação sem nenhum efeito prejudicial.

Os resultados do estudo animal de Torossian et al. (2004), sobre o efeito da aplicação intra-abdominal do ozônio no pré-operatório de cirurgias para septicemia, verificaram que essa aplicação aumentou os níveis de citocinas inflamatórias, tanto no local da infecção como sistemicamente, indicando que o ozônio pode estimular mecanismos de defesa do sistema imune.

Para Hernández (2007), uma ação oxidativa está fortemente envolvida no efeito terapêutico do ozônio, o que acarreta em mudança metabólica celular. Dessa forma, para avaliar os efeitos e certificar a segurança da ozonioterapia seria necessário que o estado de antioxidação do paciente (capacidade do organismo de responder a uma agressão oxidante) fosse pesquisado antes, durante e após a terapia. Esta pesquisa é extremamente complexa de ser realizada, pois requer a combinação de vários testes baseados em mensurações dos inúmeros índices do estresse oxidativo existentes na bioquímica sanguínea.

Quando o sangue é ozonizado, o ozônio entra em contato com as células sanguíneas, a reatividade deste é controlada pelos sistemas antioxidantes plasmáticos (como ácido úrico, ácido ascórbico e albumina). Apenas se a dose do ozônio exceder a capacidade desses sistemas podem ocorrer efeitos nocivos, como hemólise (BOCCI, 2006b; CATALDO; GENTILINI, 2005; TRAVAGLI; ZANARDI; BOCCI, 2006; TRAVAGLI et al., 2007).

A possibilidade de toxicidade do ozônio não deve impedir seu uso terapêutico. Para se evitar efeitos indesejáveis, é de fundamental importância o controle e monitoramento clínico da dose aplicada, o que pode ser alcançado pelo uso correto e cauteloso de um gerador de ozônio de precisão e conhecimento da dose terapêutica correta (BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; BOCCI, 2004a, 2006c; GROOTVELT et al., 2004a, b).

A concentração de ozônio para se alcançar efeitos terapêuticos é considerada crítica por apresentar uma estreita variação na sua dose terapêutica e baixo índice terapêutico (definido pela razão da dose mínima de efeito terapêutico e da dose mínima de toxicidade) (BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; BOCCI, 2004a, 2007; GROOTVELT et al., 2004a, b; LARINI; BOCCI, 2005). O sucesso da ozonioterapia depende de uma dose mínima, correta e segura, capaz de estimular inúmeros eventos bioquímicos, finalizando na estimulação da capacidade natural de reparação tecidual, sem efeitos nocivos (BOCCI, 2006b). Segundo Bocci (2006b, 2007), a ideia de “quanto mais, melhor” não se aplica ao ozônio.

A concentração terapêutica ideal do ozônio tem sido determinada por estudos experimentais e depende do estágio da doença e das condições do organismo (BOCCI, 2004a, 2006c; GROOTVELT et al., 2004b), e deve ser ajustada em contraste com estado redox presente (BOCCI, 2006a, b, c; CATALDO; GENTILINI,

2005; TRAVAGLI; ZANARDI; BOCCI, 2006; TRAVAGLI et al., 2007). Em pacientes com deficiências nutricionais, supostamente com menores níveis de plasmáticos de antioxidantes, é recomendada a administração de multivitamínicos previamente ao tratamento por alguns dias. Dieta rica em vegetais e frutas associada a doses cautelosas de ozônio, evita efeitos indesejáveis (BOCCI, 2006a).

Bocci (2007) sugeriu que a ozonioterapia seja iniciada em pequenas doses que vão sendo aumentadas no transcorrer do tratamento, para que se possa observar o bem estar do paciente, e, se aparecer algum sintoma de toxicidade (como sonolência e cansaço no caso da ozonioterapia sistêmica), o tratamento possa ser rapidamente modificado.

Como qualquer gás atmosférico tóxico, o ozônio em contato com a pele desencadeia uma série de eventos bioquímicos relacionados a processos oxidativos, que podem afetar a fisiopatologia deste tecido. Esta exposição da pele ao ozônio pode ser segura ou tóxica dependendo da dose, da área de exposição e da capacidade antioxidante deste tecido. O tecido cutâneo é protegido contra estresse oxidativo por uma variedade de antioxidantes, incluindo enzimas antioxidantes (glutadiona-peroxidase, superperoxidase dismutase, catalases) e antioxidantes não enzimáticos (como vitamina **E** e **C** e ácido úrico). Em geral, a epiderme contém menos antioxidantes que a derme, mas ambas sofrem ação do ozônio (VALACCHI et al., 2002; VALACCHI et al., 2003; VALACCHI et al., 2004; VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005).

Os efeitos prejudiciais gerados por produtos nocivos oriundos da exposição do ozônio à pele são capazes de atuar em células, matriz extracelular, fibras elásticas e enzimas, alterando a arquitetura e elasticidade da pele (CARLETTO; NOCOLAY, 2000).

Cotovio et al. (2001) identificou aumento de produtos oxidativos, que podem levar a alterações estruturais e elásticas na pele, gerado pela exposição *in vitro* de células humanas epidérmicas a quantidades variadas de ozônio (1-10ppm).

Pesquisando marcadores do estresse oxidativo de relevância para o processo de reparação e para capacidade de uma resposta inflamação adaptativa, Valacchi et al. (2002) e Valacchi et al. (2003) constataram, em situações experimentais de exposição da pele ao ozônio, que houve aumento da expressão da heme-oxigenase-1 (envolvida na proliferação e apoptose celular) e das metaloproteinases (envolvidas no equilíbrio entre síntese e reabsorção da matriz extracelular). Nas mesmas situações, Valacchi et al. (2004), associaram também aumento da ciclooxigenase-2 (citocinas usualmente envolvida na inflamação) e do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (importante regulador da resposta inflamatória, crucial para expressão de citocinas inflamatórias, que conseqüentemente participa do processo de reparação), bem como correlacionaram indução de proliferação e diferenciação de queratócitos. Segundo Valacchi, Fortino e Bocci (2005), adicionalmente a estas atuações, a aplicação tópica do ozônio também pode interferir na reparação tecidual por aumentar a oxigenação do tecido.

Em estudo *in vitro* para pesquisar a toxicidade do ozônio na pele, Janic et al. (2005) identificaram que a exposição das culturas de células de monócito/macrófago ao gás ozônio influenciou a atividade do NF $\kappa$ B.

Segundo Lim et al. (2006) a idade está relacionada com o aumento do estresse oxidativo das células o que pode representar implicações práticas na utilização do ozônio. Esta relação foi comprovada pelo estudo experimental dos autores, pois foi observado que a exposição de feridas dérmicas ao ozônio (0,5ppm por 6hr/dia) retardou o fechamento das mesmas em ratos mais velhos, sendo que,

em animais mais jovens esta exposição não teve efeito significativo na velocidade de fechamento, apenas uma tendência de aceleração nos primeiros dias. Esta tendência foi atribuída às propriedades antibacterianas e/ou ao aumento da tensão do oxigênio pela exposição do ozônio na área da ferida. Este trabalho também constatou que a exposição ao ozônio aumentou a atividade do NF $\kappa$ B (imunomodulador da inflamação), aumentou a expressão do TGF- $\beta$  (crucial para a remodelação tecidual) tanto dos animais jovens como dos velhos, sendo modulados de formas diferentes em decorrência da idade.

Segundo Ballas e Davidson (2001), a idade pode estar associada à prolongação do tempo da reparação tecidual por interferir em inúmeros eventos bioquímicos, não apenas por alterar a diferenciação e apoptose dos miofibroblastos.

Quanto aos efeitos biológicos do óleo ozonizado, seus compostos (aldeídos, cetonas e peróxidos de hidrogênio) possuem várias funções no organismo, que incluem: estimulação dos sistemas enzimáticos de óxido-redução; influência sobre o transporte de oxigênio aos tecidos e sobre a cadeia respiratória das mitocôndrias; ação antimicrobiana; e efeito sinérgico de estimulação da capacidade fagocitária que possuem ação germicida (LINCHETA et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2000). Por essas razões, o óleo ozonizado pode contribuir de forma benéfica na reparação tecidual de uma ferida cirúrgica, sem apresentar intolerância nem efeitos adversos ( GUERRA et al., 1997; LINCHETA et al., 2000; RODRÍGUES; CEPERO; PERDOMO, 1994; SECHI et al., 2001).

Segundo Rodrigues et al. (2004), além da excelente ação antimicrobiana, o óleo ozonizado possui também ação antiinflamatória e propriedades favoráveis à reparação tecidual, que poderiam ser utilizadas em várias situações clínicas.

Sakazaki et al. (2007) observaram que a aplicação do óleo ozonizado em

feridas experimentais inibiu infecção e hemorragia sem atrasar a reparação tecidual. A evolução histológica desta aplicação revelou coagulação sanguínea mais intensa, aumento inicial do infiltrado inflamatório e, posteriormente, proliferação do tecido de granulação de forma mais evidente. De acordo com os autores, esta aplicação em favoreceu a reparação tecidual, provavelmente pela liberação de sinais que promovem a formação do tecido de granulação.

## **2.4 Formas de administrações da ozonioterapia**

O ozônio pode ser administrado de diversas formas, exceto da endovenosa devido ao risco de embolia. A literatura descreve quatro formas principais: auto-hemoterapia maior e menor (BOCCI, 2006c); insuflação retal, na qual o gás é injetado por meio de um catéter anal (GROOTVELT et al., 2004a; VERANES et al., 1999); bolsa hermética de ozônio, na qual uma região extracorpórea é exposta ao gás (BATISTA et al., 2001; GROOTVELT et al., 2004a); e aplicações tópicas por meio da água e do óleo ozonizados (GUERRA et al., 1997; GROOTVELT et al., 2004b; LINCHETA et al., 2000).

A forma de administração mais utilizada é a auto-hemoterapia maior, na qual um volume predeterminado de sangue é removido do paciente (200-270ml), misturado a volume equivalente de gás ( $O_3 + O$ ), e reinfundido de forma endovenosa. A concentração de ozônio deve respeitar a janela terapêutica entre 10-80 $\mu$ g/ml. A auto-hemoterapia menor consiste na injeção intramuscular de pequena quantidade de sangue ozonizado (5ml) (BOCCI, 2006c; GRACER; BOCCI, 2005).

O gás de ozônio, misturado com oxigênio, também pode ser injetado de forma intramuscular, subcutânea, submucosa, intraperitoneal, intrapleural, periarticular, intra-articular, miofacial, intradiscal, intraforaminal e intralesional (BOCCI, 2004a, 2006c; BULIÉS, 1996; BULIÉS et al., 1997). Esta mistura do gás não deve ter menos que 95% de oxigênio, nem mais de 5% de ozônio (BOCCI, 2006c).

Segundo Cardoso et al. (2000), devido à alta instabilidade e a toxicidade do ozônio na sua forma gasosa, é mais seguro que este seja incorporado a fluidos (sangue, água, soluções isotônicas ou óleos) para sua utilização clínica.

Para Bocci (2006c), o método de administração deve ser selecionado de acordo com a doença e com as condições do paciente. Veranes et al. (1999) lembraram que independente da forma, a ozonioterapia apresenta baixo custo, fato que deve ser levado em consideração na escolha terapêutica.

## **2.5 Indicações da ozonioterapia**

O ozônio possui uma série de propriedades que o torna muito útil na área da saúde (VERANES et al., 1998; VERANES et al., 1999).

As publicações de Baysan, Whiley e Lynch (2000), Bocci et al. (1999) e Bocci (2004a, 2006c) enumeram diversas doenças que podem ser tratadas com a ozonioterapia, associada ou não a outras terapêuticas. São elas: 1) doenças infecciosas agudas e crônicas causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitas; 2) infecções resistentes a antibiótico, como nos casos de osteomielite, peritonite, abscesso fistuloso, pés diabéticos, picada de inseto, queimadura e escaras de

decúbito; 3) infecções herpéticas, herpes-zoster e papiloma vírus, candidose e coadjuvante no tratamento de infecção por HIV e vírus da hepatite C; 4) doenças auto-imunes, como esclerose, artrite reumatóide e Doenças de Crohn; 5) doenças com isquêmicas crônicas (isquemia cerebral e cardíaca); 6) doenças degenerativas e degeneração macular; 7) doenças pulmonares (enfisema, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e síndrome da doença respiratória aguda); 8) neuropatias, como demência senil, perda auditiva e labirintite; 9) doenças de pele, exemplos psoríase e dermatites; 10) câncer metastático quimio-resistente, reduzindo a quimiotoxicidade e visando uma melhor qualidade de vida do paciente; 11) doenças ortopédicas; 12) Síndrome da fadiga crônica e fibromialgia; 13) na cárie dental, periodontites e infecções bucais; 14) em situações emergenciais, como as que ocorrem após extensos traumas, queimaduras e septicemias, que freqüentemente levam a falência dos órgãos e morte; 15) em pré-operatório de transplantes e de cirurgias eletivas.

Bons resultados têm sido relatados após a utilização da ozonioterapia no tratamento de paciente com doenças circulatórias periféricas, neuropatia diabética (BATISTA et al., 2001), doenças oftálmicas (MENÉNDEZ et al., 2002; VERANES et al., 1998; VERANES et al., 1999), epidermo-fitoses dos pés (LINCHETA et al., 2000), exposições ósseas pós-trauma (BULIÉS, 1996), artropatias degenerativas (BULIÉS et al., 1997) e doenças respiratórias (GENT et al., 2003).

Como o diabetes é uma condição associada ao estresse oxidativo, o emprego da ozonioterapia pode proteger o sistema anti-oxidante, influenciando a taxa de glicemia, e pode manter em níveis fisiológicos marcadores de células endoteliais, cujas alterações são associadas as complicações desta doença sistêmica (ALDALAIN et al., 2001; MARTÍNEZ-SANCHES et al., 2005; RE et al., 2008).

Tem sido comprovado por estudos experimental (AL-DALAIN et al., 2001) e clínico (MARTÍNEZ-SANCHES et al., 2005) que a ozonioterapia em organismos diabéticos melhora o controle glicêmico, previne o estresse oxidativo e normaliza os níveis de peróxidos orgânicos e de superóxido dismutase ativada, eventos que são fortemente relacionados com o prejuízo endotelial. Além destes efeitos, as propriedades germicidas do ozônio e a influência deste no processo de metabolismo do oxigênio tem sido atribuídos aos bons resultados descritos no tratamento de algumas complicações diabéticas, como diminuição do número de amputações nos pacientes com gangrena, os pés diabéticos.

As características dos componentes presentes no óleo ozonizado o tornam útil no tratamento de feridas infectadas, fístulas e outros processos sépticos locais, como em micose epidérmica dos pés (LINCHETA et al., 2000) e outras lesões fúngicas (MENÉNDEZ et al., 2002).

A ozonioterapia e a terapia da câmara hiperbárica de oxigênio possuem pontos semelhantes: atuam no estresse oxidativo, estimulam compostos sinalizadores e as moléculas de superóxido e peróxido de hidrogênio e favorecem a expressão de citocinas e fatores de crescimento. As duas terapias também apresentam diferenças: o aumento da demanda de oxigênio induzido pela câmara ocorre de forma mais transitória, apenas por horas, e de forma mais indireta do que as mudanças induzidas pela ozonioterapia, que favorecem o transporte de oxigênio por vários dias (BOCCI, 2006a, 2006c; OTER; KORKMAZ, 2006). Na opinião de Bocci (2006a), a ozonioterapia é mais eficiente, prática e barata do que a câmara hiperbárica.

Steinhart, Schulz e Mutters (1999) verificaram em estudo experimental que a ozonioterapia é de grande utilidade nos casos de osteomielite refratárias por atuar

principalmente nas áreas de necrose, com deficiência de nutrição vascular. Nestas regiões, o tratamento convencional (remoção cirúrgica dos seqüestros teciduais e a antibioticoterapia) ou a câmara hiperbárica não teriam atuação adequada.

Segundo Buliés (1996), não há contra indicação para a aplicação da ozonioterapia e que as complicações relatadas na literatura devam estar relacionadas ao inadequado manejo dos métodos e das doses empregadas. Para Buliés et al. (1997), a ozonioterapia garante benefícios em diversas doenças sem riscos à saúde, por não existir complicações com o uso do ozônio.

Bocci (2004b) enfatizou que, se o ozônio for utilizado adequadamente, esse não causará nenhum efeito adverso agudo ou crônico. Além disso, devido aos bons resultados terapêuticos em muitas doenças, a ozonioterapia deveria ser aceita e utilizada por todos os hospitais, o que representaria uma revolução médica capaz de curar ou estabilizar doenças (algumas com tratamento convencional insatisfatório) de pacientes em países ricos ou pobres.

Tylicki e Rutkowski (2004) questionaram os benefícios da ozonioterapia e relataram que essa tem sido utilizada há algumas décadas sem atuação terapêutica comprovada, sendo necessários mais estudos clínicos com métodos científicos confiáveis.

Bocci, em 2006c, descreveu que seus resultados têm sido animadores, tanto quando objetivam efeito germicida como atuação na reparação tecidual, sem nunca ter observado toxicidade aguda ou crônica. Como qualquer droga, esta terapia pode ser tóxica ou ser terapêutica dependendo da concentração do gás. De acordo com este autor, a ozonioterapia não pode curar muitas doenças, como as doenças degenerativas, mas pode melhorar em muito as condições e a qualidade de vida do paciente. Pela experiência clínica própria relatada de milhares números de

aplicações da ozonioterapia em diversas doenças, o autor destacou a importância desta terapia principalmente em casos de isquemia vascular crônica, de úlceras cutâneas crônicas por isquemia regional e diabetes e de doenças degenerativas muscular atrofica relacionadas à idade.

Segundo Buliés et al. (1997a), a ozonioterapia se revela como uma futura arma terapêutica, necessitando para isso descobrir exatamente seus mecanismos intrínsecos para que se possa utilizá-la adequadamente, usufruindo as muitas propriedades que têm sido descritas.

## **2.6 Aplicações da ozonioterapia na odontologia**

No campo da odontologia, o ozônio tem sido explorado para algumas finalidades terapêuticas. Este composto tem sido aplicado na cavidade bucal tanto na forma de gás como incorporado a fluidos, como a água ou ao óleo ozonizados (BAYSAN; LYNCH, 2004; BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; HOLMES, 2003; KRASSE, 2004).

A ozonioterapia tem demonstrado resultados favoráveis para o tratamento conservador de cáries iniciais de sulcos e fissuras sem cavitação, bem como cáries cervicais e radiculares. Essas lesões de cárie são expostas ao gás de ozônio, utilizando aparelhos apropriados que se adaptam à superfície do dente, mantendo vácuo e sucção (como o HealOzone<sup>®</sup>, Kavo Dental GmbH, Biberach, Alemanha). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado que o ozônio elimina e reduz intensamente a quantidade de bactérias da lesão de cárie e oxida o material orgânico dentro da

dentina cariada, o que permite a penetração de íons de cálcio, de fosfato e de flúor para a remineralização do tecido, favorecida também pela utilização de dentífricos e materiais remineralizantes (BAYSAN; LYNCH, 2004; BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; HOLMES, 2003; KRASSE, 2004).

De acordo com Krasse (2004), a aplicação do gás de ozônio reduz o número de microorganismos cariogênicos, como também o número de microorganismos totais, pois é capaz de eliminá-los pelo mecanismo de ruptura da membrana bacteriana, revertendo as lesões de cárie, em sua maioria. De acordo com Hodson e Swift (2007), não há boa evidência clínica que suporte o uso do ozônio para o tratamento de cárie, nem que comprove que este seja superior a outros tratamentos clínicos convencionais, como controle de placa e dieta e aplicação de selantes.

Devido à atuação no sistema imunológico, no suporte sanguíneo e da atividade antimicrobiana, para Stübinger, Saber e Filippi (2006), a aplicação local do ozônio poderia ser utilizada com benefícios a reparação de feridas teciduais após a radioterapia e nos quadros de osteoradionecrose, tanto na pele como na mucosa bucal. De acordo com esses autores, o uso do gás de ozônio intrabucal é raramente encontrado na literatura, provavelmente pelo risco da inalação durante sua aplicação, o que representaria importante toxicidade pulmonar; fato que poderia ser evitado pela utilização correta de um sistema potente de sucção.

De acordo com as experiências clínicas relatadas por Agrillo et al. (2006, 2007), a ozonioterapia aplicada como terapia de suporte, em adição à terapia cirúrgica/clínica, estimula e preserva o sistema endógeno antioxidante e favorece a atividade fibroblástica e angiogênica na prevenção e no tratamento de área com osteonecrose, principalmente aquelas decorrentes de exodontias em pacientes tratados com bifosfonados. Os autores relataram utilização benéfica do gás ozônio

durante os períodos pré, trans e pós-operatório destas exodontias, como medida profilática de complicações, evitando também superinfecções.

Segundo Müller, Guggenheim e Schmidlin (2007), a ação antimicrobiana do ozônio é eficiente contra inúmeras espécies bucais. Os autores verificaram que a aplicação do gás de ozônio reduziu mais de 99% da população bacteriana de microorganismos cariogênicos incubados isoladamente. Quando biofilmes foram testados, o gás teve efeito mínimo na viabilidade microbiana, indicando que as bactérias organizadas no biofilme estavam protegidas da ação do ozônio.

Aparentemente, segundo Hems et al. (2005), as espécies bacterianas presentes no biofilme são resistentes ao ozônio, fato que deve ser atribuído à composição orgânica da matriz polissacarídea. Os autores comprovaram que o ozônio, tanto se aplicado na forma de gás ou incorporado em água, teve efeito antibacteriano nas espécies *Enterococcus faecalis*, mas pouco efeito quando estas foram embebidas no biofilme.

De acordo com Filippi (1997b, 1999a), a utilização do ozônio para desinfecção da unidade de água dos equipamentos odontológicos tem sucesso estabelecido desde a década de 90. Em 1997b, já com oito anos de monitoramento, comparando vários sistemas para esta desinfecção, o autor confirmou que há boa evidencia sobre a eficiência da desinfecção desta água pelo ozônio. Em 2001, Filippi enfatizou que esta ozonização é o método de desinfecção que tem vantagens superiores em relação a outros, principalmente pelo fato de proporcionar rapidamente a esterilização. Mesmo assim, o autor lembrou que nenhum método pôde manter o equipamento livre de contaminação durante seu uso, sendo necessárias mais pesquisas.

No estudo realizado por Walker et al. (2003), a utilização do ozônio não foi

capaz de reduzir eficientemente as bactérias constituintes do biofilme presente no sistema da unidade de água do equipamento odontológico.

Garduño et al. (1995) salientaram bons resultados terapêuticos na redução da placa bacteriana pelo emprego da água ozonizada após seu estudo *in vivo*, que comparou a quantidade de *Streptococcus mutans* depois de bochechos com água ozonizada e com água não ozonizada por sessenta segundo.

Velano et al. (2001) mostraram, *in vitro*, que o tempo máximo para a inativação total de *Streptococcus aureus* tratados com água não ozonizada foi muito superior quando comparado com a utilização de água ozonizada (0,6mg/ml), indicando efeito mais rápido desta.

Os resultados do estudo *in vitro* de Nagayoshi et al. (2004a) demonstraram que, a água ozonizada, na concentração de 2 a 4mg/L, foi eficiente para matar bactérias bucais gram-positivas e gram-negativas e a *Cândida Albicans* em culturas puras. Os autores consideraram que esta água apresentou forte efeito contra bactérias do biofilme e teve potencial de inibir o acúmulo experimental de placa bacteriana. Assim, sugeriram que esta água tem potencial de ser utilizada na redução de infecções causadas por microorganismos bucais.

Segundo Estrela et al. (2006), o emprego da água ozonizada também pode ser uma opção para os aparelhos de ultra-som para lavagem de instrumental odontológico. Os autores constataram *in vitro* a eficiência deste sistema de lavagem com ação antimicrobiana comprovada contra *Stafilococcus aureus*.

Segundo Filippi (1997a), a água ozonizada pode ter propriedades terapêuticas, como favorecer a hemostasia, promover a reparação de feridas e estimular a vascularização. Este fato associado à atividade antimicrobiana desta água deveria ser explorado visando à utilização desta forma de aplicação do ozônio

em cirurgia bucal como alternativa ao soro fisiológico estéril, sendo que este não possui nenhuma propriedade terapêutica. A água ozonizada, mesmo sendo isotônica não apresentaria desvantagens em relação ao uso do soro. De acordo com esse autor, a água ozonizada utilizada nas unidades de água dos equipamentos odontológicos durante os procedimentos cirúrgicos poderia alcançar concentrações adequadas (acima de  $4\mu\text{gO}_3/\text{ml}$  de água) para terem atividade antimicrobiana e desinfecção da área operada. Lembraram que não há conhecimento da concentração ideal para se alcançar efeitos terapêuticos, sendo necessário mais pesquisas.

Pesquisando o potencial terapêutico da utilização no trans-operatório da água ozonizada diretamente dos equipamentos odontológicos, Filippi (1999b) constatou que a concentração do ozônio na água diminuía conforme o aumento da temperatura (a concentração diminuía aproximadamente 40% quando a temperatura passava de  $20^\circ\text{C}$  para  $37,5^\circ\text{C}$ ). O gerador utilizado nesta pesquisa produziu água ozonizada na concentração inicial de  $12,48\mu\text{gO}_3/\text{ml}$ . Quando amostras desta água saída de irrigadores foram analisadas, a concentração encontrada foi de  $5,52\mu\text{gO}_3/\text{ml}$  e, quando aquecida a  $37,5^\circ\text{C}$ , de  $2,64\mu\text{gO}_3/\text{ml}$ . O autor pôde observar que a utilização da água ozonizada na concentração de 2,5 a  $3,5\mu\text{gO}_3/\text{ml}$  não produziu nenhum efeito positivo ou negativo na reparação pós-operatória de exodontias de terceiros molares com osteotomia quando comparados à irrigação com soro fisiológico estéril. Esse estudo também constatou que não foi encontrado ozônio em nenhuma concentração quando a água ozonizada foi utilizada na alta rotação, micromotor e aparelhos de ultra-som.

Um estudo envolvendo 250 pacientes, comparando a aplicação da água ozonizada com o soro fisiológico durante a osteotomia para cirurgia de exodontia de

terceiros molares, verificou idêntica reparação pós-operatória com as duas irrigações e, quando a água ozonizada foi utilizada, observou-se redução da ocorrência de infecções após as cirurgias (BRAUNER<sup>2</sup>, 1992, apud STÜNBINGER; SADER; FILIPPI, 2006).

De acordo com Ebensberger, Pohl e Filippi (2002), a água ozonizada pode ser útil na limpeza de dentes acidentalmente avulsionados, previamente ao reimplante, devido suas características antimicrobianas e bioquímicas que poderiam ter algum efeito benéfico nos cementoblastos e fibroblastos remanescentes. Pesquisando esta possibilidade, os autores descobriram que aquelas células de dentes extraídos e irrigados por dois minutos com água ozonizada ( $2,5-3,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) mostraram um discreto aumento da marcação do Antígeno nuclear de proliferação celular, em relação a outro grupo irrigado com soro fisiológico. De acordo com os mesmo autores, os resultados evidenciaram que a água ozonizada pôde ter efeito estimulador na proliferação dos cementoblastos e fibroblastos periodontais, melhorar o metabolismo celular e oferecer desinfecção adicional, não apenas pelos mecanismos mecânico da irrigação. Além disso, a água ozonizada não apresentou efeito prejudicial na viabilidade dos remanescentes celulares da superfície radicular.

Segundo Stübinger, Saber e Filippi (2006), a água ozonizada representa um importante agente terapêutico na regeneração periodontal, para tratamento de gengivites e periodontites, devido a seu possível estímulo na proliferação celular e suas propriedades antimicrobianas.

Em estudo *in vitro*, de acordo com Krozer, Hall e Ericsson (1999), o uso da água ozonizada na implantodontia pode ser útil para descontaminação da superfície

---

<sup>2</sup> Brauner AW. Periodontology: New methods. Ozone Sci Eng 1992;14:165-76.

do implante no tratamento da perimplantite, pois proporcionou a remoção de microorganismos sem deixar resíduos que prejudicasse a osseointegração, fato que ocorreu quando outros produtos químicos foram utilizados.

Erdösi, Filippi e Meyer (2005) pesquisaram a possibilidade de utilizar água ozonizada na desinfecção do osso coletado em sugador apropriado durante cirurgias bucais, visando a utilização deste procedimento antes de enxertos autógenos na implantodontia. Os autores verificaram que a água ozonizada não atingiu o efeito antimicrobiano (concentração aproximadamente de  $12\text{mgO}_3/\text{L}$ ). Os autores justificaram que a ação antimicrobiana da água ozonizada foi impossibilitada pela presença de proteínas orgânicas na mistura coletada, composta de fragmentos ósseos, sangue, saliva e bactérias. Sugeriram que pesquisas viabilizassem a coleta isolada dos fragmentos ósseos, nos quais a água ozonizada poderia ter melhor efeito antimicrobiano.

O uso da água ozonizada como agente anti-séptico foi sugerido por Huth et al. (2006), uma vez que o ozônio tem alto poder antimicrobiano e não tem sido notado desenvolvimento de resistência farmacológica com sua utilização na purificação de água de abastecimento e preservação de alimentos.

Pesquisando a citotoxicidade da aplicação do gás ozônio por um minuto em culturas de células epiteliais e em fibroblastos gengivais, Huth et al. (2006), verificaram que nas concentrações de gás utilizadas ( $6 \times 10^6$  a  $2 \times 10^2 \mu\text{g m}^3$ ) houve redução da viabilidade celular, com nítido aumento no número de morte celular. Os autores lembraram que em muitos trabalhos, concentrações inferiores são utilizadas. Em contraste com o gás, quando utilizaram solução de tampão fosfato tamponado ozonizado ( $1,25$  a  $2,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), nenhum efeito tóxico foi revelado, demonstrando sua alta biocompatibilidade com células bucais, melhor do que outros produtos testados

(digluconato de clorexidina, hipoclorito de sódio e água oxigenada). Sendo assim, segundo os autores, a alta biocompatibilidade do ozônio aquoso permite que este seja utilizado em irrigações de dentes e alvéolos, sem nenhum efeito negativo para as células bucais.

Nagayoshi et al. (2004b), em estudo experimental, verificaram baixa citotoxicidade da água ozonizada em fibroblastos de ratos, fato atribuído à rápida degradação do ozônio quando entra em contato com os compostos orgânicos. Os autores verificaram que a viabilidade de *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*, presentes em túbulos dentinários, diminuiu significativamente após irrigação com água ozonizada (4mg/L), resultados que sugeriram a indicação do uso desta água na endodontia. Para eles as vantagens do uso da água ozonizada incluem seu potencial antimicrobiano, sua rápida ação antimicrobiana, sua fácil aplicação e ausência de mutagênese.

Nas condições *in vitro* analisadas por Estrela et al. (2007), nenhum dos métodos testados foi adequado para inativar a *Enterococcus faecalis* dos canais radiculares de dentes humanos, bactéria freqüentemente associada a lesões persistentes ao tratamento endodôntico. Os autores testaram as irrigações por 20 minutos com água ozonizada (4mg/L<sup>-1</sup>), hipoclorito de sódio (2,5%) e clorexidina (2%) ou a aplicação do gás ozônio.

Tanto a água como o gás pode ser utilizado para limpeza de próteses totais (STÜBINGER; SABER; FILIPPI, 2006). O estudo de Arita et al. (2005) verificou que a imersão de próteses totais com base de resina acrílica em água ozonizada (2 ou 4mg/L) foi útil na eliminação da *Candida albicans*.

Após revisão sistemática da literatura sobre o uso da ozonioterapia na odontologia, Azarpazhooh e Limeback (2008) constataram que: há evidências

conflitantes para uso na endodontia e como agente antimicrobiano; há resultados positivos comprovados para a desinfecção da unidade de água e para limpeza de próteses totais; e que os relatos do uso do ozônio na cirurgia bucal são escassos. Segundo os autores, as aplicações clínicas do ozônio em odontologia não têm alcançado forte nível de evidência nem boa relação custo benefício (devido ao alto custo de aparelhos com sistemas de vácuo), sendo necessárias pesquisas clínicas melhores conduzidas do que as encontradas na literatura atual.

Com finalidades terapêuticas na odontologia, o óleo ozonizado já foi testado, e têm sido relatados bons resultados quando empregado em gengivo-estomatite herpética aguda (RODRÍGUES; CEPERO; PERDOMO, 1994), estomatite protética (LOPÉZ et al., 2003; PILOTO; URRUTIA, 2000), alveolites (GUERRA et al., 1997) e como medicamento intracanal (PEREIRA, 2002; SIQUEIRA et al., 2000) e agente antimicrobiano (SECHI et al., 2001),

### 3 PROPOSIÇÃO

A proposição desta pesquisa foi avaliar *in vivo* os efeitos biológicos do ozônio diluído em água, em duas concentrações diferentes, na reparação tecidual de feridas dérmicas induzidas em ratos, após irrigações cirúrgicas trans e pós-operatórias, por meio de avaliação macroscópica e microscópica.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostra experimental

Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), machos, com peso entre 350mg-450mg e idade entre 3-6 meses. Durante todo o período da pesquisa, os animais foram mantidos, em condição padrão de alimentação com ração e água *ad libitum*. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), que emitiu parecer favorável à sua realização, protocolo n° 26/05 (Anexo A).

### 4.2 Procedimentos realizados

Os procedimentos realizados seguiram o seguinte protocolo:

- Anestesia geral pela aplicação do anestésico via intramuscular na dose de 1ml/kg (cloridrato de cetamina, Dopalen<sup>®</sup> - Vetbrands) e do relaxante muscular via intramuscular na dose de 0,3mg/kg (cloridrato de xilazina, Rompum<sup>®</sup> - Bayer SA).
  - Realização de tricotomia no dorso do animal, em área dimensionada para a realização das feridas cirúrgicas e para as instalações dos apósitos;
  - Anti-sepsia no dorso do animal, com digluconato de clorexidina a 2%.

- Execução do procedimento cirúrgico que compreendeu a realização de incisão no dorso do animal, com formato de circunferência de 5mm de diâmetro e 5mm de profundidade, e excisão da derme e subcutâneo, expondo a fáscia muscular subjacente. Para padronização dessas feridas foi utilizado punch metálico de 5mm de diâmetro, estéril e com cursor de borracha para delimitar sua profundidade durante a aplicação (Figuras 4.1 e 4.2).

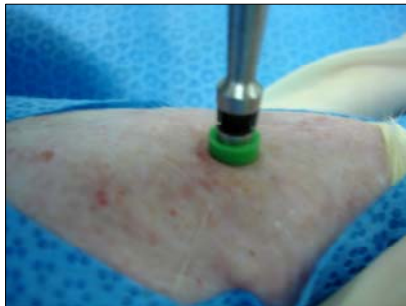


Figura 4.1 - Utilização do punch

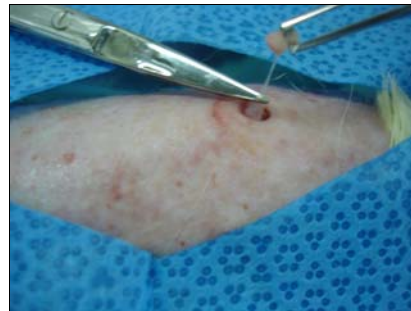


Figura 4.2 - Excisão do tecido

- Após a realização das feridas cirúrgicas, os animais foram divididos em 4 grupos (12 animais para cada grupo), de acordo com o tratamento realizado:
  - $GO_3>$  - Grupo que foi irrigado com água ozonizada na concentração de 4ppm - 47,7 mgO<sub>3</sub>/L (maior concentração);
  - $GO_3<$  - Grupo que foi irrigado com água ozonizada na concentração de 1ppm - 13,0 mgO<sub>3</sub>/L (menor concentração);
  - $G_{\text{água}}$  - Grupo que foi irrigado com água não ozonizada, Água MilliQ® (Millipore), controle positivo;
  - $G_{\text{nada}}$  - Grupo que não recebeu irrigação, controle negativo.

- As irrigações, nos três grupos indicados, foram realizadas com fluxo constante, de intensidade e velocidade regulares, e foram realizadas por meio de seringas (20ml) e agulhas (0,7x30mm) estéreis descartáveis, com aspiração concomitante. Foram realizadas imediatamente após a cirurgia, de modo que se perdurasse por 10 minutos o contato dos tecidos cruentos com o líquido, e foram repetidas diariamente por 5 minutos no pós-operatório até o dia do sacrifício do animal.
- Após a realização das feridas e irrigações, o tecido cruento foi protegido pela colocação de apósito individual, diariamente até o segundo dia de pós-operatório. Foram utilizados Band-aid<sup>®</sup> (Johnson & Johnson) adaptados no formato das lesões e esses recobertos por esparadrapo impermeável (Cremer S. A<sup>®</sup>).
- Para realização das irrigações e/ou troca dos apósitos, os animais foram sedados pelos mesmos fármacos utilizados para os procedimentos cirúrgicos (anestésico e relaxante muscular) em doses reduzidas, suficientes para a execução dos procedimentos.
- Os animais foram sacrificados no período de 2 dias, 7 dias e 14 dias de pós-operatório, por inalação de dióxido de carbono. Em cada período foram sacrificados 16 animais, que corresponderam a 4 amostras de cada um dos 4 grupos, totalizando 48 animais.
- Após o sacrifício, cada ferida foi fotografada e, em seguida, uma peça cirúrgica foi obtida da região submetida à cirurgia. Quando necessário, no segundo e terceiro período do sacrifício, foi realizada nova tricotomia na região em torno da lesão, para facilitar o acesso fotográfico e a obtenção do material para fixação.

- Os espécimes removidos foram fixados em formol 10% por no mínimo 24 horas e, posteriormente, processados histologicamente para inclusão em parafina, cortes semi-seriados em seu longo eixo de 5  $\mu\text{m}$  e coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) e reações de imunohistoquímica.

Todos os procedimentos experimentais foram criteriosamente realizados dentro dos princípios gerais e fundamentais de cirurgia, junto ao Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia Prótese e Traumatologia da FOUSP. O ato operatório transcorreu sem contaminação e com o menor trauma possível e foi realizado por um único cirurgião. As peças cirúrgicas obtidas após o sacrifício dos animais foram processadas, pelo mesmo profissional, junto à Disciplina de Patologia Bucal e à Disciplina de Patologia Geral, do Departamento de Estomatologia da FOUSP.

### **4.3 Produção da água ozonizada**

A água ozonizada foi produzida por meio do gerador de ozônio (Ozone & Life<sup>®</sup> 3.0), utilizado nas potências de 10 e 5. A fonte de oxigênio empregado foi proveniente de cilindro de oxigênio medicinal com fluxo de 1mL/min ajustado e regulado por fluxômetro de precisão (Rotarex<sup>®</sup>, USA). Nestas condições, a quantidade de ozônio produzida pelo gerador era de 47,7mgO<sub>3</sub>/L e 13,0mgO<sub>3</sub>/L, respectivamente para aquelas duas potências. O ozônio gerado era transportado por mangueira de silicone para 2 litros de água Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore), contida em um

lavador de gás em vidro com 1,58m de altura. O tempo de ozonização foi cronometrado e padronizado em 10 minutos.

A concentração final de  $O_3$  na água foi monitorada imediatamente após sua produção e previamente à sua utilização, empregando o analisador colorimétrico pelo kit Chemets<sup>TM</sup> (Chemetrics, INC-USA) (modelo GM6000), garantindo uma dose precisa e conhecida. Estas concentrações aferidas correspondiam a 4,0ppm (quando o gerador foi utilizado em 10 de potência com produção de 47,7mg $O_3$ /L) e a 1,0 ppm (quando o gerador foi utilizado em 5 de potência com produção de 13,3mg $O_3$ /L).

Previamente a cada produção da água ozonizada que seria utilizada na pesquisa, o lavador de vidro empregado era submetido a ozonização de 2 litros de água Milli-Q<sup>®</sup> em potencia máxima do gerador com fluxo de oxigênio de 1ml/min por 5 minutos, para proporcionar a limpeza daquele vidro.

As temperaturas ambientes da sala e a umidade relativa do ar foram monitoradas em todos os dias durante a produção da água ozonizada, e correspondiam aproximadamente a 26°C e 66% de umidade.

Após a produção da água ozonizada, esta era coletada por meio de mangueiras de silicone estéreis e acondicionada em recipientes de vidros com tampa de Teflon<sup>®</sup> também estéreis, que foram mantidos sob refrigeração, entre 8 a 10°C, até o momento do seu uso, que ocorreu no máximo em até uma hora da sua ozonização. Para o preenchimento das seringas utilizadas para a irrigação, a água era acondicionada em recipientes de vidros estéreis.

## 4.4 Análise das lesões induzidas

### 4.4.1 Avaliação macroscópica – análise morfométrica

Imediatamente após o sacrifício dos animais, as feridas foram fotografadas por meio de câmera digital (Sony<sup>®</sup> Cybershot, 5 megapixels) afixada de forma a manter a padronização de distância focal, utilizando sempre aumento ótico de 3X.

As imagens das feridas foram submetidas ao software Adobe<sup>®</sup> Photoshop<sup>®</sup> Elements 6.0, e transferidas para o software de morfometria digital (ImageLab2000<sup>®</sup>) utilizando computador Pentium<sup>®</sup> IV, 512MHz, monitor HP Pavillion<sup>®</sup>, 800X600 dpi. Essa avaliação foi realizada pelo mesmo examinador que não teve conhecimento da identificação das amostras e que foi submetido a um período de padronização para esta avaliação.

As feridas foram analisadas pelo software quanto à porcentagem de perímetro (Figura 4.3) e área (Figura 4.4), medidas em pixels, bem como quanto à relação entre essas duas dimensões, obtendo-se o fator de forma (fator de forma =  $3\pi\text{área}/\text{perímetro}^2$ ). A mesma análise foi realizada em quatro feridas no momento da sua confecção, cuja média foi utilizada como referência inicial.

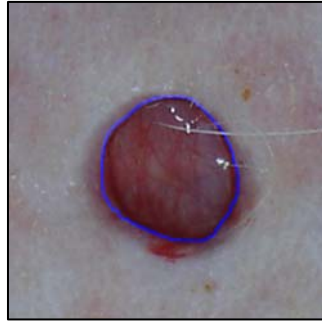


Figura 4.3 - Delimitação do perímetro.

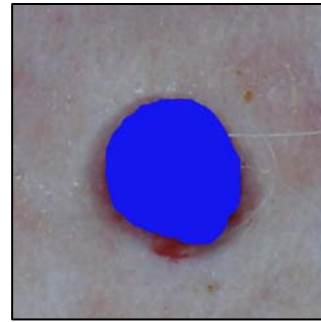


Figura 4.4 - Cálculo da área.

Com essas dimensões obtiveram-se dados quanto ao processo de contração da ferida nos diferentes tempos experimentais. A contração tecidual foi considerada mais regular quanto mais próximo o valor do fator de forma estivesse do valor de referência, e irregular, quanto mais inferior do mesmo.

Os dados obtidos por esta análise foram objeto de estudo quantitativo e, os referentes à área e ao fator de forma, também de estudo estatístico.

Para estudo estatístico foi utilizado o Teste de Hipótese Wilcoxon, que pertence a uma categoria estatística de procedimentos chamados de não paramétricos ou livres de distribuição. O nível de significância ( $\alpha$ ) utilizado foi de 5%, com intervalo de confiança de 95% e com 3 graus de liberdade. Em função das características específicas das amostras, essas foram distribuídas em pares e pela associação dos grupos que empregaram água ozonizada ( $GO_3>$  e  $GO_3<$ ) e dos grupos controles ( $G_{\text{água}}$  e  $G_{\text{nada}}$ ), para testar a hipótese de semelhança ou diferença na comparação das distribuições dos grupos. Foi utilizado para tal estudo o software estatístico SPSS® (Statistical Package for Social Sciences), para Windows® em versão 13.0.

#### 4.4.2 Avaliação microscópica

##### *4.4.2.1 análise histomorfológica*

Os cortes corados com HE foram analisados em microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400X. Esta análise foi realizada em duplo cego, por dois observadores independentes que não conheciam os dados das amostras. Empregou-se uma escala arbitrária de expressão classificada de 0 a 3 (0=ausente; 1=pouco; 2=moderado; 3=intenso) para identificação de: re-epitelialização, infiltrado inflamatório, presença de necrose, edema, vasos neoformados, população de fibroblastos jovens, síntese de colágeno e deposição e distribuição de fibras da matriz extracelular (matriz colagênica). Com esta análise foi possível avaliar de forma quantitativa as diferenças histomorfológicas entre os grupos.

##### *4.4.2.2 análise histomorfométrica*

Foi realizada análise de histomorfometria digital, que seguiu protocolo estabelecido por Matos et al. (1994) no Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia (LIDO) da FOU SP. Essa avaliação foi realizada pelo mesmo avaliador

que não teve conhecimento da identificação das amostras e que foi submetido a um período de padronização para esta avaliação.

Para o estudo de histomorfometria digital, as imagens das lâminas histológicas coradas com HE foram capturadas por câmera tipo CCD (Sony®) acoplada a microscópio Jeol® e placa de digitalização de imagens (Captivator®) e transferidas para software de morfometria digital (ImageLab2000®), utilizando computador Pentium® IV, 512MHz, monitor HP Pavillion®, 800X600 dpi. As imagens do campo histológico (aumento de 400X), na região da lesão induzida, foram digitalizadas e analisadas (em porcentagem de pixels) quanto à celularidade (quantidade dos elementos celulares presentes, tais como células inflamatórias e fibroblastos, medida pela presença de tons roxos indicativas de núcleos celulares), ao espaço branco (podendo ser interpretado por edema, vasos sanguíneos, artefato e/ou espaços entre fibras colágenas dentro da matriz organizada) e quanto às fibras colágenas e matriz colagênica (medida pela porcentagem de tons róseo indicativas de tais fibras e matriz). Esses elementos teciduais forneceram uma estimativa da evolução do processo inflamatório/reparativo em cada tempo experimental.

Para cada animal foram analisadas três imagens histológicas, sendo que, no período de 2 dias, foram quantificados 12 campos consecutivos para cada imagem (seis em cada borda da ferida), e nos períodos de 7 e 14 dias, esse número foi de 9 campos, conforme ilustração esquemática nas figuras 4.5, 4.6 e 4.7, respectivamente, obtendo-se uma média final.

Todos os dados obtidos por esta histomorfometria foram analisados de forma quantitativa e foram objetos de estudo estatístico, seguindo a metodologia descrita anteriormente.

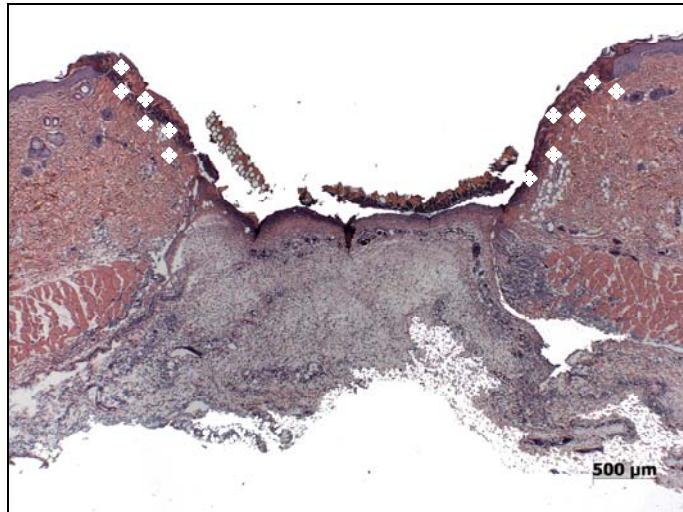


Figura 4.5 - Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 2 dias

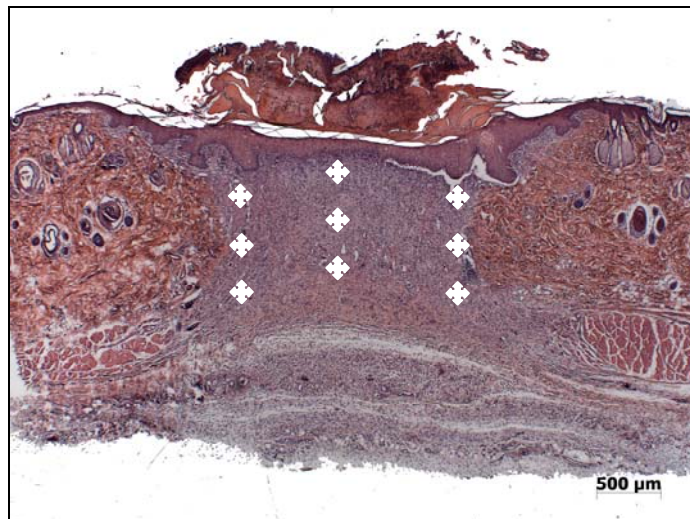


Figura 4.6 - Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 7 dias

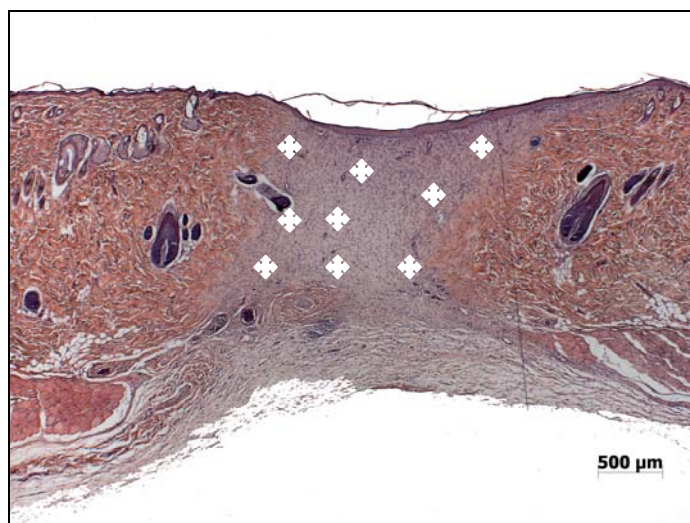


Figura 4.7 - Esquema dos campos escolhidos para histomorfometria no período de 14 dias

#### 4.4.2.3 análise imunoistoquímica

Para as reações imunoistoquímicas foi utilizada a técnica de estreptoavidina-biotina-peroxidase e foram utilizados os anticorpos *colágeno tipo-I* (20141-NOVOTEC<sup>®</sup>) e *anti-actina* (KO609 – DAKO<sup>®</sup>), sendo que as diluições, o tempo de incubação e a recuperação antigênica foram otimizados para cada anticorpo seguindo o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, descrito resumidamente a seguir:

1. Desparafinização dos cortes de 5 µm de espessura em dois banhos de xilol, à temperatura ambiente por 20 minutos;
2. Reidratação em série de etanol em concentrações decrescentes, com passagem em etanol absoluto por três vezes, etanol 95% e 85%, durante 5 minutos cada;
3. Remoção de pigmentos formólicos por imersão em solução de hidróxido de amônia a 10%, em etanol 95%, durante 10 minutos;
4. Lavagem em água destilada, 2 banhos de 5 minutos cada;
5. Recuperação dos sítios antigênicos em solução de ácido cítrico monoidratado, pH 6,0 em banho-maria a 95°C por 30 minutos, para as lâminas que receberam os anticorpos *anti-actina*;
6. Lavagem em água destilada, 2 banhos de 5 minutos cada;
7. Bloqueio da peroxidase endógena tecidual com imersão do material em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes (6%) e álcool metílico na proporção 1:1, em dois banhos de 15 minutos cada;
8. Lavagem em água destilada, 2 banhos de 5 minutos cada;

9. Três banhos de solução tampão de TRIS (Tri-hidroxi-metil-aminometano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pH 7,4 por 5 minutos cada.
10. As etapas seguintes foram realizadas automaticamente, com o auxílio do sistema de coloração universal Autostainer DAKO<sup>®</sup> (Corporation, Glostrup, Denmark). Após serem acopladas no equipamento, as lâminas contendo os cortes foram submetidas à incubação com os anticorpos primários diluídos em solução TRIS, pH 7,4, acrescido de albumina a 1%, contendo azida sódica a 0,1% (BSA – Biotest<sup>®</sup> S/A – São Paulo, Brasil). A diluição de trabalho para o anticorpo primário *colágeno tipo-I* foi 1:300 com tempo de incubação de 30 minutos, e para o *anti-actina* de 1:200 por 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e em solução tampão de TRIS, pH 7,6. Como soro secundário e complexo terciário foi utilizado o kit Envision Dako<sup>®</sup>- LSAB (Corporation, Glostrup, Denmark) por 30 minutos. A revelação da reação foi feita por imersão em solução de cromógeno diaminobenzidina (DAB, 3,3 – diaminobenzidina, Sigma Chemical<sup>®</sup> CO., St Louis, MO/USA) por 10 minutos. Os cortes foram então lavados em TRIS pH 7,6 e água destilada, e contra-corados com Hematoxilina de Mayer por 10 minutos. Posteriormente, lavados novamente por 10 minutos em água destilada.
11. Concluída as etapas automáticas, as lâminas foram retiradas do equipamento e foram desidratadas manualmente em uma série de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 100%) e diafanizados em xilol seguindo para montagem em Permount<sup>®</sup> (Fisher Scientific, Fair Law, NJ/USA).

Como controle positivo foi utilizado fragmento da pele normal do dorso do animal, e o controle negativo foi obtido com a suspensão do anticorpo primário durante a realização da reação.

As lâminas coradas pela imunistoquímica foram analisadas em microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400X. Este estudo foi realizado em duplo cego, por dois observadores independentes que não conheciam as identificações das amostras. Os dados desta análise foram avaliados de forma quantitativa.

A análise da marcação dos anticorpos *colágeno tipo-I*, foi baseada na distribuição da expressão antigênica e na intensidade de matriz formada, classificada em escala arbitrária de expressão de 0 a 3 (0=ausente; 1=pouco expressivo; 2=expressão moderada; 3=expressão intensa). Para esta classificação, no período de 2 dias foi observada a região da borda da ferida; no período de 7 dias a região do centro da ferida; e no último período foram classificados tanto o centro como a borda da ferida. A reação foi considerada positiva quando houve coloração castanha, e negativas para as lâminas que não apresentaram tal coloração.

Para análise imunistoquímica comparativa entre os grupos com relação à coloração do anticorpo *anti-actina*, no período de 7 dias, foi utilizado um sistema de contagem de miofibroblastos, sendo que foram considerados células positivas, aquelas com citoplasma de coloração castanho escuro. Considerou-se 100% da população de miofibroblastos dividida pelo número de campos presentes no corte da lesão, obtendo-se uma média. Nas lâminas correspondentes aos períodos de 2 e 14 dias foi realizado a verificação da ausência da marcação.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação macroscópica – análise morfométrica

Os resultados da análise morfométrica com relação à porcentagem de perímetro, área e fator de forma estão demonstrados nas tabelas 5.1, e ilustrados pela figura 5.1. Os mesmos valores calculados no momento da confecção da ferida, como referência inicial, foram: 1134,61 de perímetro; 93180,12 de área; e 0,87 de fator de forma.

Tabela 5.1- Dados da análise morfológica com relação à porcentagem de perímetro, área e fator de forma

Períodos	Grupos	Perímetro	Área		Fator de forma	
		Média – pixels %	Média- pixels %	Desvio Padrão +/-	Média	Desvio Padrão +/-
2 dias	GO <sub>3</sub> >	639,22	29178,86	6691,59	0,83	0,04
	GO <sub>3</sub> <	704,42	32587,42	4017,32	0,83	0,06
	G <sub>água</sub>	605,39	24753,06	3850,75	0,85	0,02
	G <sub>nada</sub>	628,49	26794,03	3272,82	0,85	0,02
7 dias	GO <sub>3</sub> >	566,68	21910,34	1275,87	0,86	0,02
	GO <sub>3</sub> <	537,84	20030,61	5817,55	0,86	0,02
	G <sub>água</sub>	546,74	20568,68	20568,68	0,86	0,02
	G <sub>nada</sub>	474,21	14824,70	8296,04	0,77	0,09
14 dias	GO <sub>3</sub> >	239,75	3869,15	3768,09	0,76	0,11
	GO <sub>3</sub> <	206,81	2306,74	939,13	0,67	0,08
	G <sub>água</sub>	235,77	3301,00	2285,36	0,70	0,15
	G <sub>nada</sub>	185,70	2444,38	1800,28	0,81	0,05

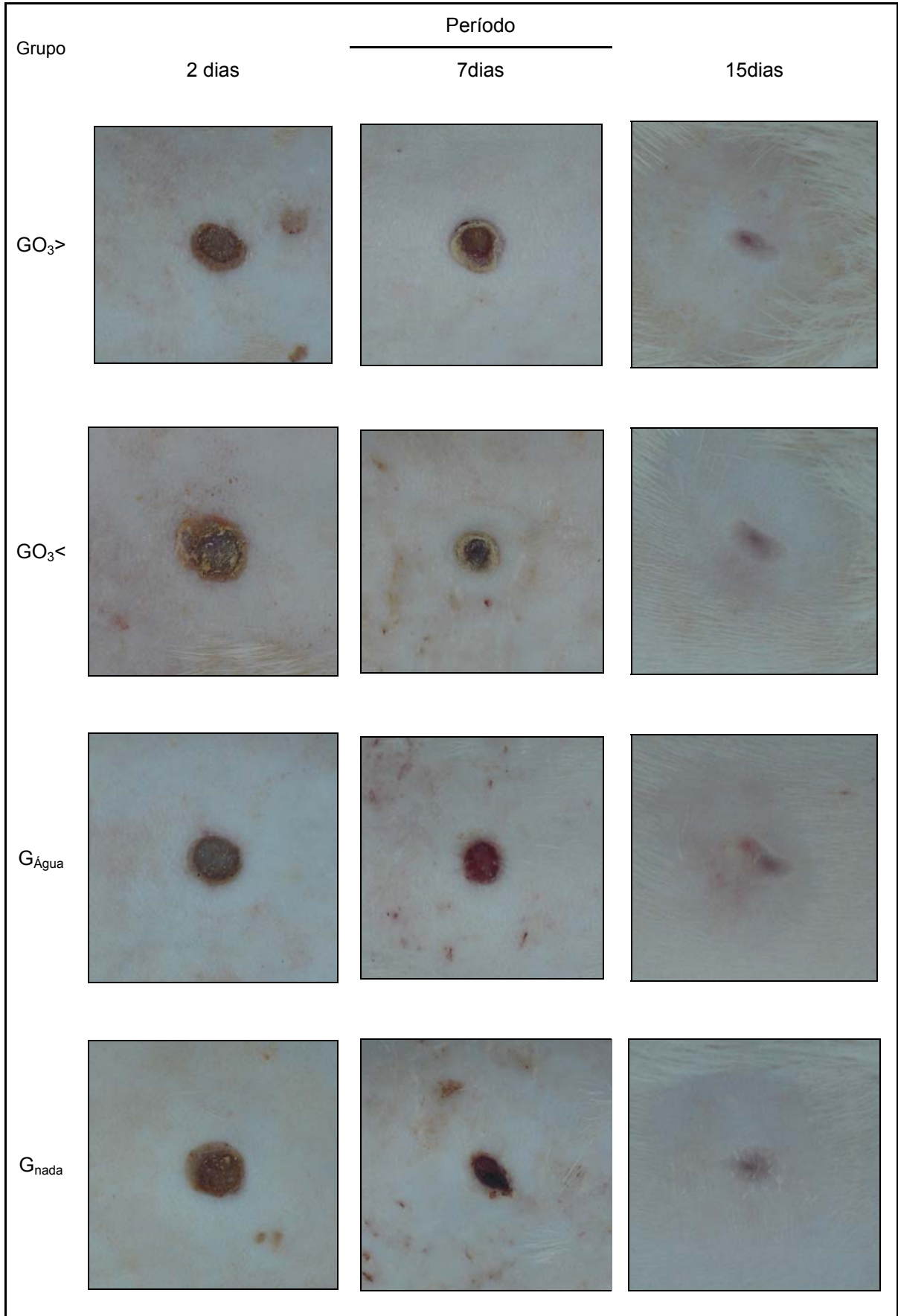


Figura 5.1 - Fotografias das feridas de acordo com os grupos e períodos

Com relação ao estudo quantitativo da área, no primeiro período, a maior média encontrada foi no  $GO_3<$ , seguido em ordem decrescente pelos  $GO_3>$ ,  $G_{nada}$  e  $G_{água}$ . No período de 7 dias, os grupos que receberam irrigação ( $GO_3>$ ,  $GO_3<$  e  $G_{água}$ ) apresentaram área maior do que o grupo não irrigado ( $G_{nada}$ ), sendo que a mesma ordem foi  $GO_3>$ ,  $G_{água}$ ,  $GO_3<$  e  $G_{nada}$ . No período de 14 dias, a área se tornou similar entre todos os grupos (Gráfico 5.1).

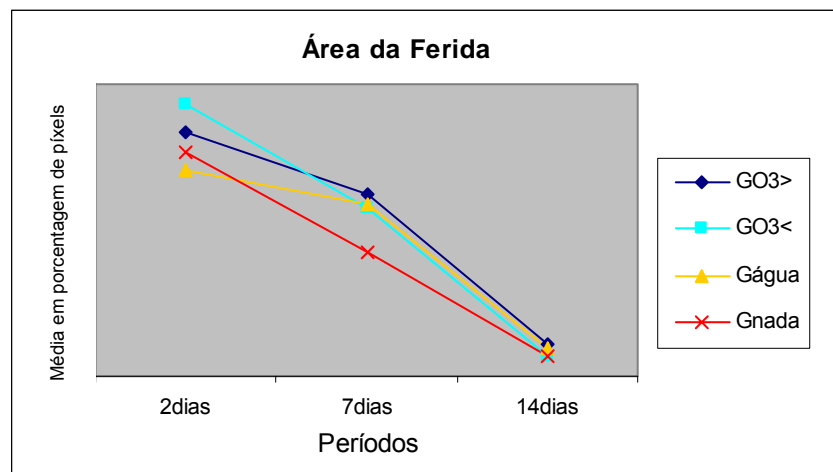


Gráfico 5.1 - Morfometria - representação da área da ferida

Nos três períodos, o estudo estatístico de distribuição da área verificou que houve diferenças significantes entre o  $GO_3>$  em relação aos  $G_{água}$ ,  $G_{nada}$  e  $GO_3<$ , e entre o  $GO_3<$  e  $G_{água}$ . As demais distribuições analisadas revelaram-se estatisticamente pouco significantes (Anexo B).

No período de 2 dias, pelo estudo quantitativo, a média do fator de forma entre os grupos irrigados com água ozonizada foi igual, da mesma forma para os outros grupos controles. No período de 7 dias, os valores desta característica para os grupos que receberam irrigação foram iguais e superiores ao grupo controle.

negativo. No período de 14 dias, o  $GO_3>$  e  $G_{nada}$  revelaram fatores de forma semelhantes e superiores com relação aos outros, que também foram similares entre si (Gráfico 5.2).

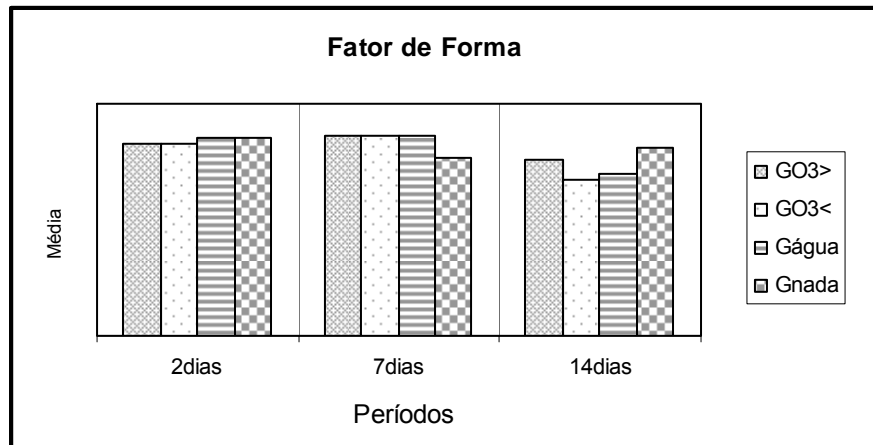


Gráfico 5.2 - Morfometria - representação do fator de forma

Nos três períodos, o estudo estatístico de distribuição do fator de forma verificou que houve diferenças significantes entre o  $GO_3>$  em relação ao  $G_{água}$  e ao  $G_{nada}$ , e semelhanças entre o  $GO_3<$  e o  $G_{água}$ . A comparação do grupo irrigado com água ozonizada na menor concentração com o controle negativo foi estatisticamente diferentes nos dois primeiros períodos e semelhante no último. As demais distribuições analisadas revelaram-se estatisticamente pouco significantes (Anexo C).

## 5.2 Avaliação microscópica

### 5.2.1 Análise histomorfológica

Os dados da análise histomorfológica dos cortes corados com HE, de acordo com a escala arbitrária de expressão, estão demonstrados na tabela 5.2.

Tabelas 5.2 - Dados da análise histomorfológica de acordo com escala arbitrária de expressão

Períodos	Grupos	Re-	Infiltrado	Necrose	Edema	Vasos neo-	Fibroblastos	Síntese de	Matriz
		epitelialização	inflamatório			formados	jovens	colágeno	colagênica
		Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média
2dias	GO <sub>3</sub> >	1	2,7	1,3	2,0	1,7	1,0	2,0	2,0
	GO <sub>3</sub> <	0	2,3	1,8	2,5	2,3	1,3	1,0	2,3
	G <sub>água</sub>	0	1,7	1,3	1,0	1,0	0,3	0,7	2,0
	G <sub>trata</sub>	1	2,5	1,5	2,3	1,0	0,8	0,5	1,0
7dias	GO <sub>3</sub> >	2,3	2,3	2,0	1,0	1,3	2,8	1,0	2,3
	GO <sub>3</sub> <	2,3	1,8	1,5	1,0	1,5	2,5	0,5	1,8
	G <sub>água</sub>	1,3	2,8	2,0	1,3	1,8	2,0	1,3	2,0
	G <sub>trata</sub>	2,0	2,0	1,5	0,5	1,5	2,0	1,5	1,5
14dias	GO <sub>3</sub> >	3,0	1,0	0,0	0,3	1,0	2,3	2,0	2,7
	GO <sub>3</sub> <	3,0	1,0	0,0	0,7	1,7	2,7	1,3	3,0
	G <sub>água</sub>	3,0	1,0	0,0	1,0	1,3	2,7	1,3	2,3
	G <sub>trata</sub>	3,0	1,0	0,0	0,3	1,0	3,0	1,7	2,7

Os principais aspectos histológicos analisados de forma quantitativa em microscópio de luz convencional de acordo com escala arbitrária de expressão estão ilustrados pelas figuras 5.2 a 5.4 e descritos a seguir:

-no período de 2 dias: discreta proliferação epitelial apenas nos  $GO_3<$  e  $G_{\text{água}}$ ; menor expressão de infiltrado inflamatório, de necrose e de edema no grupo  $G_{\text{água}}$ , seguido em ordem crescente pelos  $GO_3<$ ,  $G_{\text{nada}}$  e  $GO_3>$ ; expressão mais intensa da neoformação vascular, fibroblastos jovens e de síntese de colágeno para os grupos  $GO_3>$  e  $GO_3<$ ; e matriz menos expressiva para o grupo não irrigado.

-no período de 7 dias: menor expressão da proliferação epitelial para os  $G_{\text{água}}$  e  $G_{\text{nada}}$ ; características do processo inflamatório mais expressivas no grupo  $G_{\text{água}}$ , seguido em ordem decrescente pelos  $GO_3>$ ,  $GO_3<$  e  $G_{\text{nada}}$ ; pouca diferença entre os grupos com relação a neoformação vascular; expressão mais marcante de fibroblastos jovens em ambos grupos que foram irrigados com água ozonizada; formação de matriz colagênica mais expressiva nos grupos que receberam irrigação, principalmente para o  $GO_3>$ ; e relação inversa para a síntese de colágeno.

-no período de 14 dias: epitélio sempre contínuo sobre a ferida em todos os cortes analisados; pouca expressão de infiltrado inflamatório e edema e ausência de necrose em todos os grupos; vascularização mais evidente no grupo  $GO_3<$ ; menor expressão de fibroblastos jovens para o  $GO_3>$ ; expressão intensa de síntese de colágeno mais evidente nos  $GO_3>$  e  $G_{\text{nada}}$ ; expressão intensa de matriz colagênica nos grupos irrigados com água ozonizada e no grupo controle positivo com relação ao grupo controle positivo.

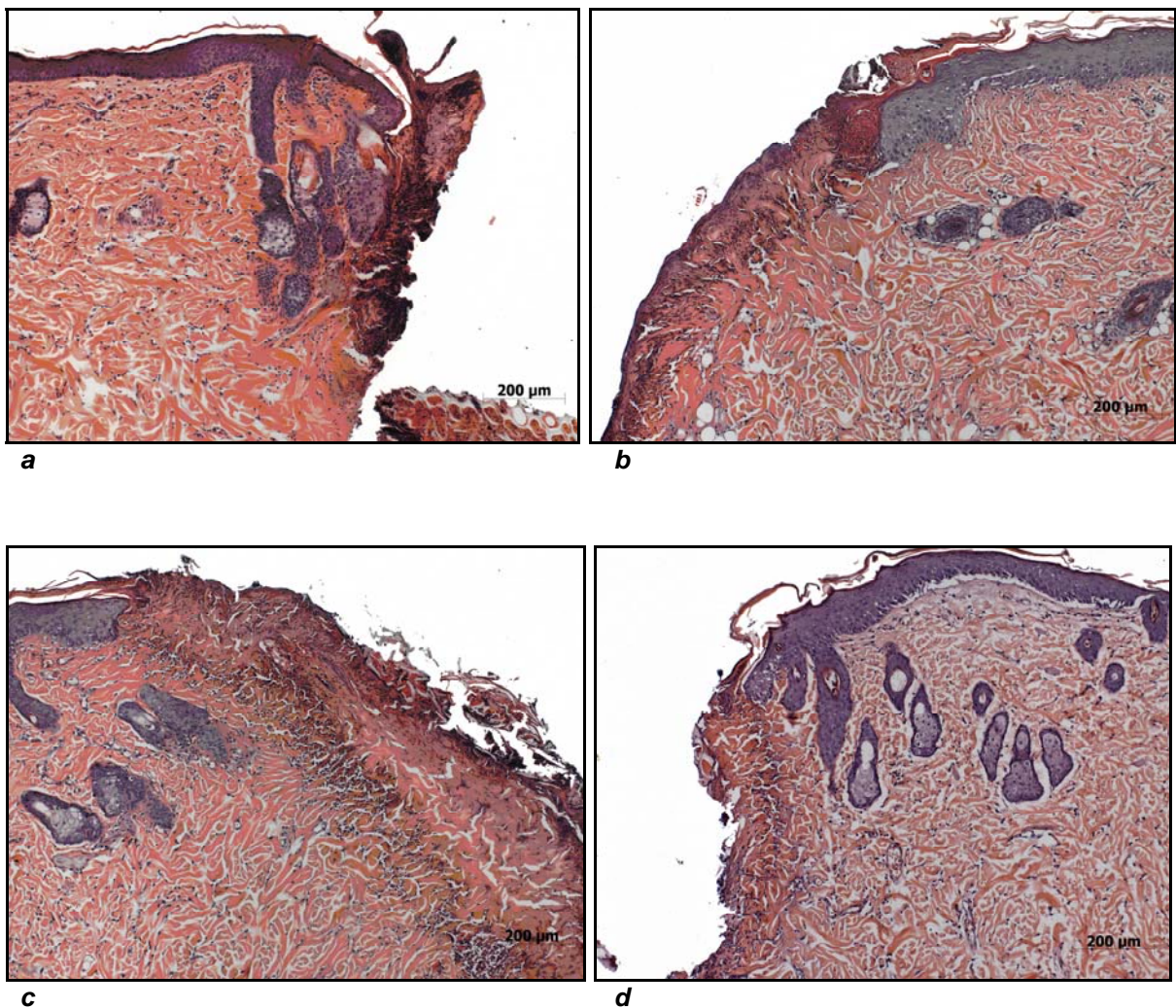


Figura 5.2 - Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 2 dias. Em **a** ( $GO_3>$ ), **b** ( $GO_3<$ ), **c** ( $G_{\text{água}}$ ) e **d** ( $G_{\text{nada}}$ ) foram observados: discreta re-epitelialização das bordas (principalmente em **a** e **c**), infiltrado inflamatório (maior expressão em **a**), edema (menor expressão em **c**), necrose, aberturas de espaços vasculares, fibroblastos jovens, síntese de colágeno e deposição de matriz colagênica desorganizada (menos expressivas em **d**) (HE, aumento 200X)

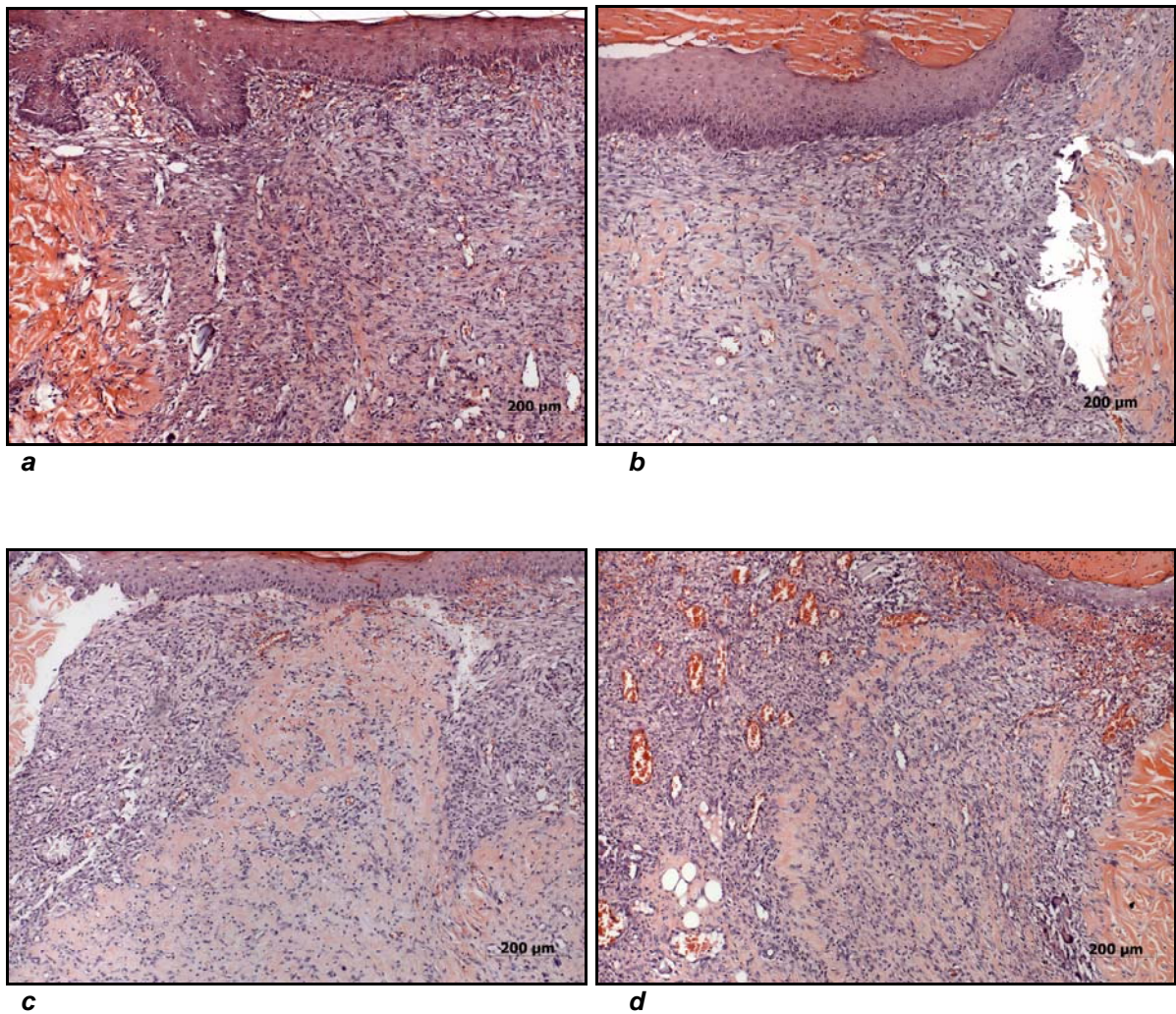


Figura 5.3 - Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 7 dias. Em **a** (GO<sub>3</sub>>), **b** (GO<sub>3</sub><), **c** (G<sub>água</sub>) e **d** (G<sub>nada</sub>) foram observados: re-epitelialização da ferida (menos expressivo em **c** e **d**), infiltrado inflamatório mais expressivo em **c**, aberturas de espaços vasculares, fibroblastos jovens (principalmente em **a** e **b**), síntese do colágeno (maior expressão em **c** e **d**) e deposição de fibras colágenas (maior expressão em **a** e **b**) (HE, aumento 200X)

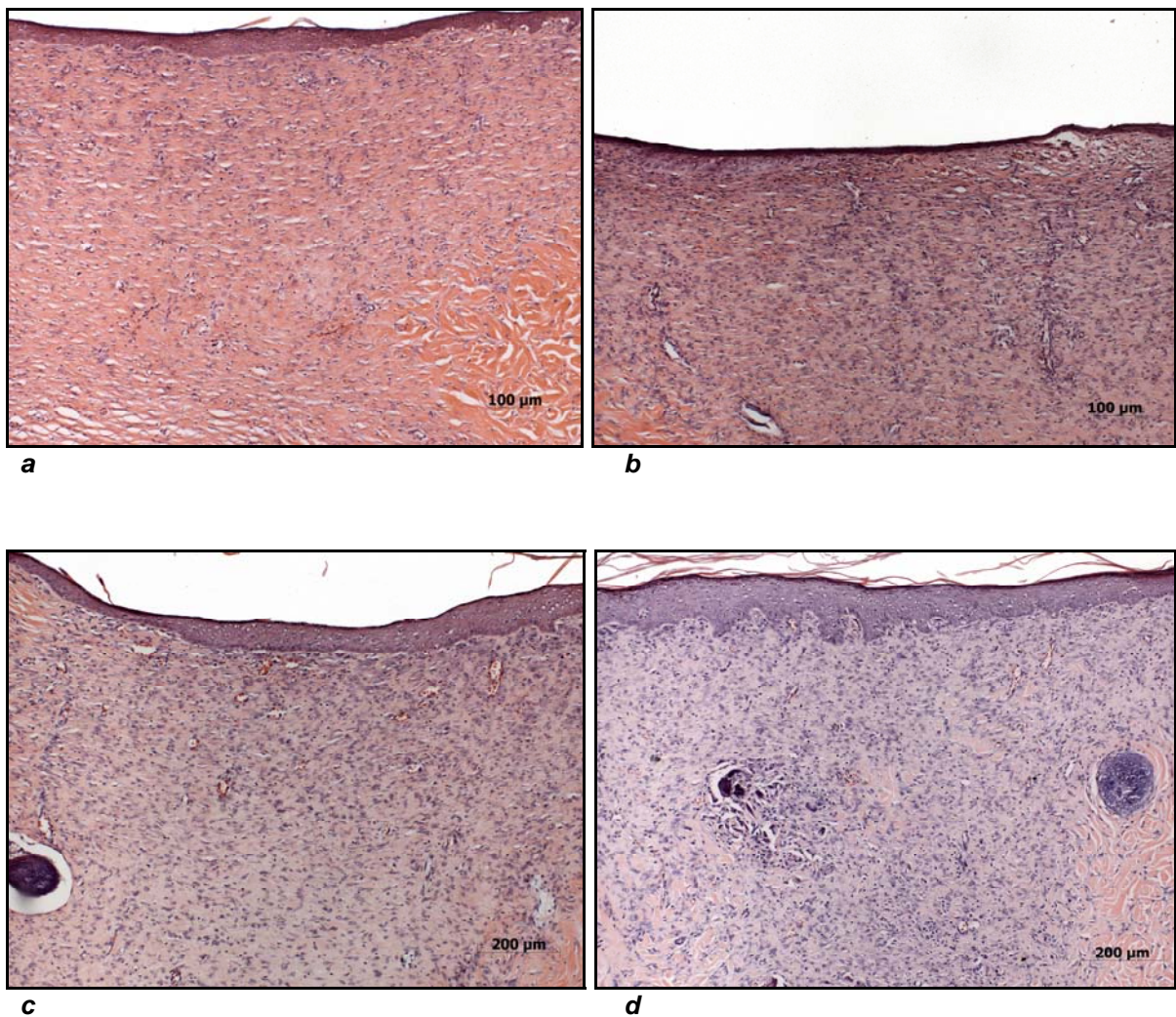


Figura 5.4 - Fotomicrografia dos cortes histológicos de cada um dos grupos no período de 15 dias. Em **a** ( $GO_3>$ ), **b** ( $GO_3<$ ), **c** ( $G_{\text{água}}$ ) e **d** ( $G_{\text{nada}}$ ) foram observados: re-epitelialização completa sobre o local da feridas abertas, espaços vasculares, fibroblastos jovens, síntese do colágeno (maior expressão em **a** e **d**), síntese de colágeno e intensa expressão da deposição de fibras da matriz extracelular, de forma mais organizada em **a** e **d** (HE, aumento 200X)

### 5.2.2 Análise histomorfométrica

Os dados da análise histomorfométrica digital, com relação às porcentagens de celularidade, espaço branco e matriz colagênica, estão descritos na tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Dados da análise histomorfométrica digital

Período	Grupo	Celularidade		Espaço Branco		Matriz Colagênica	
		Média %	Desvio padrão +/-	Média %	Desvio padrão +/-	Média %	Desvio Padrão +/-
2 dias	GO <sub>3</sub> >	9,4	8,6	13,1	6,8	77,5	7,2
	GO <sub>3</sub> <	13,0	8,8	17,8	5,7	69,2	8,9
	G <sub>água</sub>	11,0	7,7	15,8	4,8	73,2	8,0
	G <sub>nada</sub>	10,5	9,3	17,8	11,2	71,7	9,0
7dias	GO <sub>3</sub> >	6,7	2,3	6,3	3,2	87,0	4,2
	GO <sub>3</sub> <	8,3	4,3	9,3	5,6	82,4	9,2
	G <sub>água</sub>	7,6	3,2	9,2	4,9	83,2	5,6
	G <sub>nada</sub>	6,9	5,0	8,2	3,5	84,9	5,0
14dias	GO <sub>3</sub> >	5,6	2,5	14,7	8,4	79,7	7,7
	GO <sub>3</sub> <	4,1	1,5	12,6	7,0	83,3	6,5
	G <sub>água</sub>	4,4	2,2	12,1	9,0	83,5	7,7
	G <sub>nada</sub>	5,3	1,9	15,7	9,0	79,0	8,4

Pelo estudo quantitativo, tanto no primeiro como no segundo período, o GO<sub>3</sub>< apresentou maior porcentagem de celularidade, seguido em ordem decrescente pelos G<sub>água</sub>, G<sub>nada</sub> e GO<sub>3</sub>>. No último período, esta relação se inverteu (Gráfico 5.3). Pelo estudo estatístico, não foram encontradas diferenças ou semelhanças significantes (Anexo D).

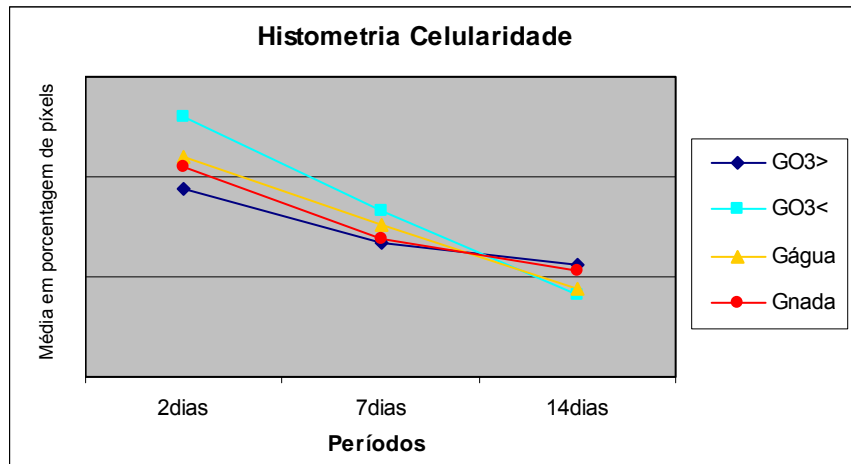


Gráfico 5.3 - Histomorfofometria - representação da celularidade

Com relação à porcentagem de espaço branco pelo estudo quantitativo, no período de 2 dias, o valor desta porcentagem foi menor para o  $GO_3>$ , seguido crescentemente pelos valores dos  $G_{água}$ ,  $GO_3<$  e  $G_{nada}$ . Os dados desta característica para os  $GO_3<$  e  $G_{nada}$ , em comparação aos outros dois grupos, foram superiores no período de 7 dias e inferiores no de 14 dias, sendo a diferença maior neste último período (Gráfico 5.4).

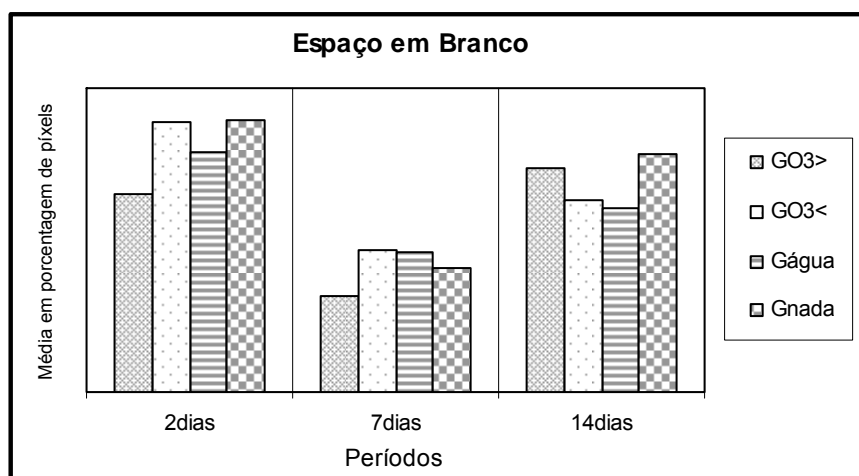


Gráfico 5.4 - Histomorfofometria – representação do espaço branco

O estudo estatístico da porcentagem do espaço branco verificou que: com relação ao  $GO_3>$  houve diferenças significantes em comparação aos  $G_{\text{água}}$  e  $G_{\text{nada}}$ , exceto com relação a este último grupo no segundo e terceiro períodos, nos quais foram semelhantes; com relação ao  $GO_3<$  existiram semelhanças significantes em comparação aos  $G_{\text{água}}$  e  $G_{\text{nada}}$ , exceto com relação a este último grupo no primeiro período, no qual foram diferentes. As demais distribuições analisadas mostraram-se estatisticamente pouco significantes (Anexo E).

No período de 2 e 7 dias pelo estudo quantitativo, a porcentagem de matriz colagênica foi maior para o  $GO_3>$ , havendo pouca diferença entre os demais grupos. No período de 14 dias, a porcentagem desta matriz foi menor para os grupos  $GO_3>$  e  $G_{\text{nada}}$ , e maior para os outros dois grupos (Gráfico 5.5). Pelo estudo estatístico, não foram encontradas diferenças ou semelhanças significantes (Anexo F).

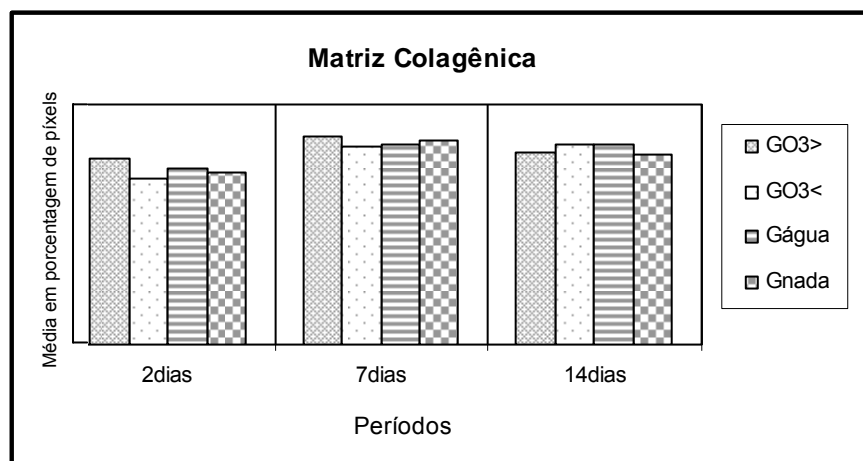


Gráfico 5.5 - Histomorfometria – representação da matriz colagênica

O grupo  $GO_3<$  se comportou de forma similar com o  $G_{\text{água}}$ , principalmente para as análises das porcentagens de celularidade no último período e de espaço

em branco e de matriz colagênica no segundo e terceiro período de observação. Nas mesmas ocasiões, os dados identificados para o grupo GO<sub>3</sub>> se comportaram de forma mais semelhante dos observados para o grupo G<sub>nada</sub> do que com relação aos demais grupos.

### 5.2.3 Análise imunoistoquímica

As informações obtidas pela análise quantitativa dos cortes corados pelas reações imunoistoquímicas para *colágeno tipo-I* estão ilustradas pelas figuras 5.5 e 5.6. A disposição das fibras colágenas em alguns campos observados se apresentou ora em feixes finos e paralelos, ora de forma densa ou enovelada, não sendo possível correlacioná-la com o tipo de tratamento realizado. Os resultados da classificação em escala arbitrária da expressão de intensidade de matriz formada estão representados na tabela 5.4, a seguir:

Tabela 5.4 – Dados da análise da imunoistoquímica para *colágeno tipo-I* de acordo com escala arbitrária de expressão

<i>Colágeno Tipo I</i>	<u>2dias</u>		<u>7dias</u>		<u>14dias</u>	
	Borda	Centro	Borda	Centro	Borda	Centro
	Média	Média	Média	Média	Média	Média
GO <sub>3</sub> >	2	2	3	2		
GO <sub>3</sub> <	1,6	1	3	2,5		
G <sub>água</sub>	1,3	1,6	3	2,5		
G <sub>nada</sub>	2	1	3	2		

Os resultados quantitativos da contagem de miofibroblastos nos cortes corados pelas reações imunoistoquímicas para anticorpos *anti-actina*, no período de 7 dias, foram: para o  $GO_3>$  de 0,61 (célula/campo); para o  $GO_3<$  de 0,90; para o  $G_{\text{água}}$  de 0,38; e para o  $G_{\text{nada}}$  de 0,57. As diferenças na forma de distribuição e de localização dessas células não foram consideradas relevantes, bem como a presença das mesmas no período de 2 e 14 dias.

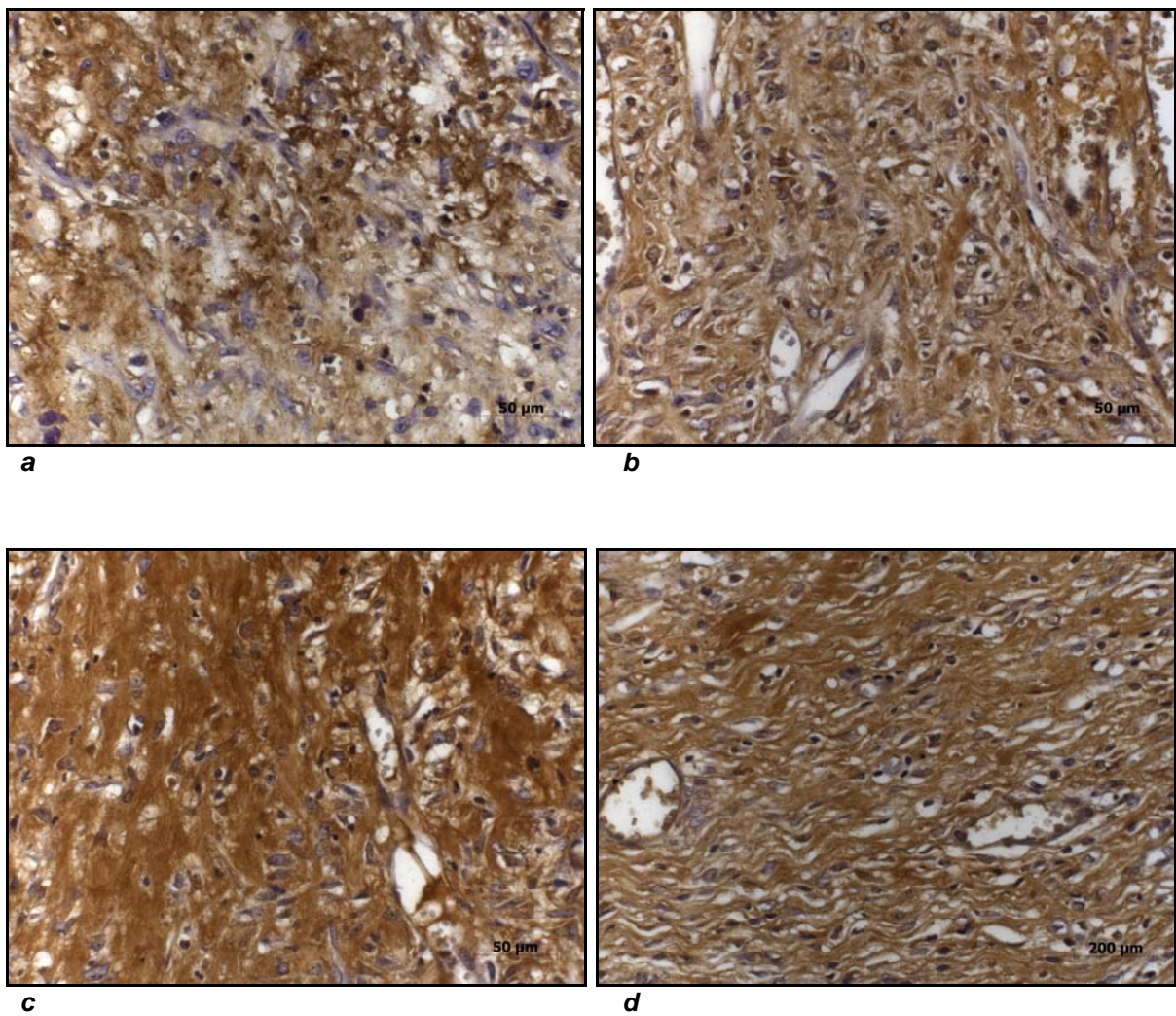


Figura 5.5 - Fotomicrografia dos cortes histológicos corados pela reação de imunistoquímica para anticorpo *colágeno tipo-1* de cada um dos grupos no período de 7 dias. Em **a** ( $GO_3>$ ), **b** ( $GO_3<$ ), **c** ( $G_{\text{água}}$ ) e **d** ( $G_{\text{nada}}$ ) foram observados: forte expressão para este anticorpo, ora em feixes finos e paralelos, ora de forma densa e enovelada (aumento 400X)

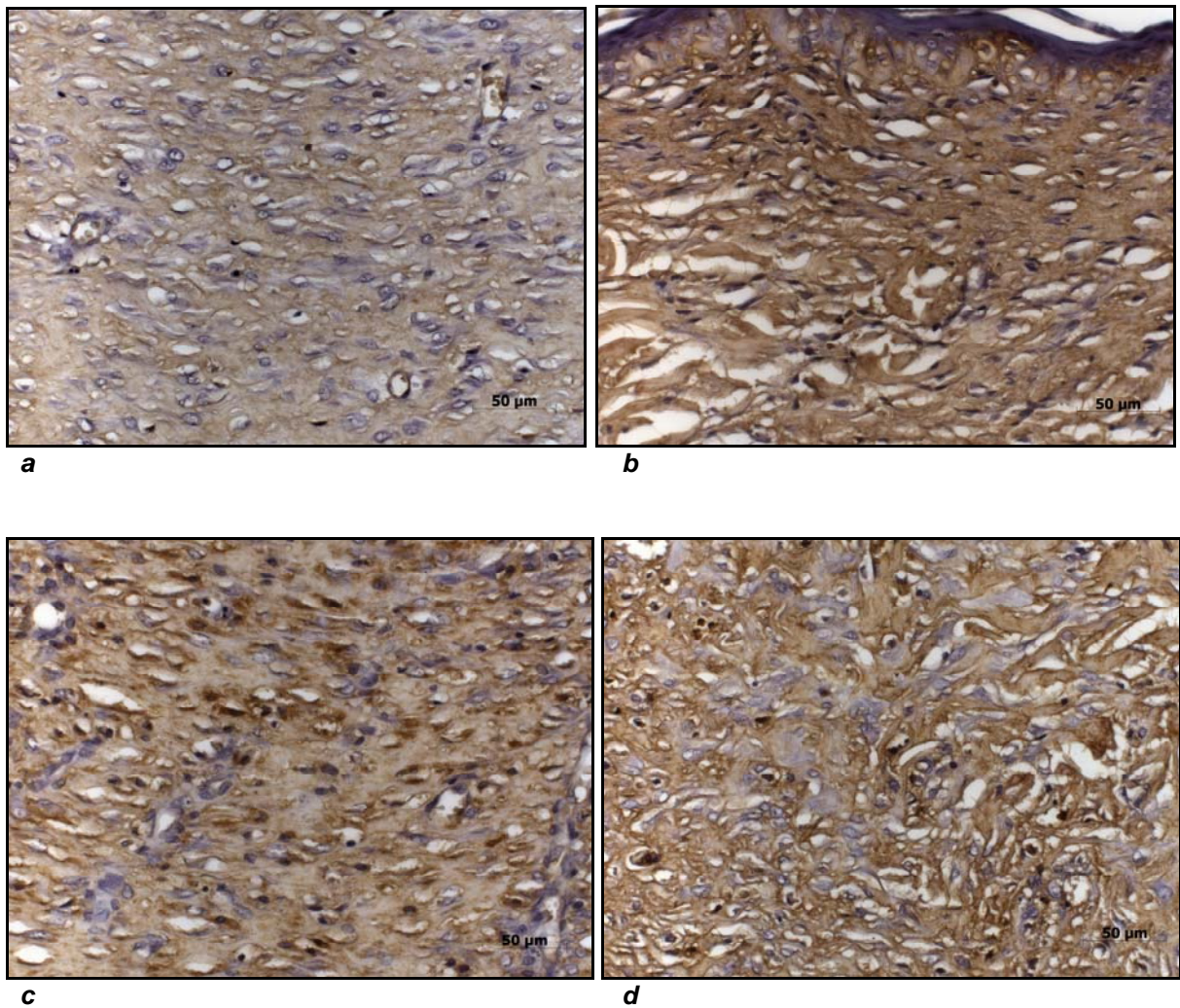


Figura 5.6 - Fotomicrografia dos cortes corados pelas reações de imunohistoquímica para anticorpo *colágeno tipo-I* de cada um dos grupos no período de 14 dias. Em **a** (GO<sub>3</sub>>), **b** (GO<sub>3</sub><), **c** (G<sub>água</sub>) e **d** (G<sub>nada</sub>) foram observados: forte expressão para este anticorpo no estroma, com disposição das fibras colagênicas em feixes finos (principalmente em **a**, **b** e **d**) e em forma mais densa (principalmente em **c**) (400X)

## 6 DISCUSSÃO

O ozônio, quando em contato com o organismo, é capaz de desencadear respostas biológicas por influenciar no balanço redox, pois, devido suas características bioquímicas, desencadeia reações oxidantes que originam moléculas sinalizadoras de vários processos celulares (ERO e LOP) (BOCCI, 2004a, 2006c, 2007).

Porquanto não há dúvidas que o estado redox modula a reparação tecidual (KANDLER et al., 2005; HERNÁNDEZ, 2007; SEN et al., 2002; SEN; ROY, 2008) e está envolvido no desenvolvimento de muitas doenças (BOCCI, 2006a; ÇANAKÇI; ÇICEK; ÇANAKÇI, 2005; HERNÁNDEZ, 2007; SCHULZ; STECHMILLER, 2006). De tal modo, a ozonioterapia pode ter papel terapêutico para a reparação tecidual (SCHULZ; STECHMILLER, 2006; SEN; ROY, 2008).

Nos acreditamos que o ozônio, tanto na forma de gás como diluído em água, pode ser capaz de interferir na reparação tecidual quando em contato com tecidos cruentos, uma vez que alguns autores têm comprovado *in vitro* que a exposição celular a este oxidante suscita performance sobre as ERO (HERNÁNDEZ, 2007; RE et al., 2008). Lembramos também que têm sido descritas boas evidências da interação do ozônio com diferentes componentes celulares (BOCCI, 1996), seja aplicado local ou sistemicamente (BOCCI, 1996, 2006c; RE et al., 2008).

Enfatizamos que têm sido pesquisados e comprovados efeitos biológicos na epiderme e derme da exposição ao gás ozônio (JANIC et al., 2005; LIM et al., 2006; VALACCHI et al., 2002, 2003, 2004; VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005), citando a capacidade desta exposição de alterar a arquitetura e a elasticidade desses

tecidos (CARLETTO; NOCOLAY, 2000; COTOVIO et al., 2001). Acreditamos que este tecido representa um apropriado modelo de estudo para pesquisar a reparação tecidual.

Outras características do ozônio indicadas na literatura poderiam contribuir para torná-lo útil na resposta biológica, como o fato de ser uma molécula produzida fisiologicamente durante o processo de inflamação (WENTORTH et al., 2002) e de atuar via sistemas endógenos de antioxidante (RE et al., 2008), estimulando a capacidade natural de reparação tecidual (BOCCI, 2006b).

As análises macroscópicas e microscópicas dos resultados encontrados nesta pesquisa demonstraram que houve diferenças no processo de reparação tecidual entre os métodos propostos, o que pôde indicar alguma interação do ozônio neste processo.

Com relação aos resultados da análise morfológica quantitativa, no período de 7 dias, todos os grupos que receberam irrigação apresentaram área maior do que o grupo não irrigado; diferença justificada parcialmente pela ação mecânica exercida pela lavagem diária. Detalhamos que entre esses grupos irrigados, os que empregaram água ozonizada apresentaram uma redução maior da área entre o primeiro e segundo período de observação, principalmente o GO<sub>3</sub><. Adicionalmente, no período de 14 dias, a menor área encontrada entre todos os grupos foi para o GO<sub>3</sub><, e a maior para o GO<sub>3</sub>>.

Complementarmente, o estudo estatístico da área dos resultados morfológicos revelou que ambos os grupos irrigados com água ozonizada apresentaram diferenças significantes em comparação ao grupo controle positivo.

Dessa forma, os resultados com relação à área puderam sugerir atuação do ozônio diluído em água na reparação das lesões teciduais, com possível

favorecimento ao fechamento tecidual, e evidenciaram a importância da concentração.

Embora tenha sido possível identificar pelo estudo quantitativo e estatístico diferenças significativas dos dados morfológicos da área entre os grupos testados ( $GO_3>$  e  $GO_3<$ ) e os controles, ponderamos que não houve retardo no processo de reparação tecidual em nenhuma situação, sendo que todas as lesões apresentaram fechamento condizente com o processo normal de reparação.

Foi possível constatar que a diminuição da área entre os períodos teve correlação com o fenômeno de contração tecidual da ferida, avaliada por meio do fator de forma. Durante o intervalo de tempo entre o primeiro e segundo período de observação, todos os grupos irrigados apresentaram menor diminuição da área em relação ao grupo não irrigado, o que provavelmente possibilitou uma contração mais lenta e conseqüentemente mais regular, fato comprovado pelos valores dos seus fatores de forma que foram superiores em relação ao outro grupo; esses dados puderam ser interpretados como uma ferida de formato mais regular. Do mesmo modo, o grupo não irrigado, teve uma redução maior da área e conseqüentemente um formato mais irregular, constatada pelo seu valor do fator de forma, que foi o menor. Neste momento, ambos os grupos irrigados com água ozonizada apresentaram fator de forma estatisticamente diferente com relação ao controle negativo.

No último intervalo de tempo, aquela correlação entre velocidade de fechamento e formato da lesão pôde ser identificada de maneira inversa, na qual os grupos que foram irrigados tiveram maior redução da área acarretando em uma contração e formato mais irregulares (fator de forma inferior), e o grupo não irrigado apresentou menor redução e conseqüentemente as mesmas características mais

regulares. Contudo, entre os grupos irrigados, o que utilizou água ozonizada na maior concentração apresentou maior fator de forma. Isto nos permitiu sugerir que o ozônio diluído em água na concentração de 4ppm teve efeito na contração tecidual durante o processo de reparação, contribuindo para um fechamento mais regular da ferida. Especificamente, neste último período, apenas o  $GO_3$  apresentou diferença estaticamente significativa do fator de forma com relação ao grupo controle positivo e negativo.

Assim, os resultados encontrados pela avaliação macroscópica demonstraram que supostamente a utilização contínua da água ozonizada por meio de irrigações cirúrgicas, dependendo da concentração, possa implicar possivelmente em uma redução mais rápida da área da ferida e em alterações da contração tecidual no processo de reparação. Na prática, dependendo da situação clínica, essas alterações podem representar benefícios à reparação tecidual, principalmente em feridas que necessitam de auxílio para o fechamento tecidual, por exemplo, feridas crônicas, como mencionou Schulz e Stechmiller (2006) e Valacchi e Bocci (1999).

O processo de contração tecidual é modulado principalmente pelos miofibroblastos. A aplicação do ozônio já teve efeito demonstrado em muitos mediadores bioquímicos que participam da diferenciação, proliferação, atuação e apoptose dessas células (FEUGATE; LI; MARTINS-GREEN, 2002; KWON et al., 2006). Podemos citar, por exemplo, sua interferência comprovada *in vitro* no PDGF, TGF- $\beta$  (VALACCHI; BOCCI, 1999) e *in vivo* na expressão direta do óxido nítrico (CHEN et al., 2008a, b).

A identificação dos miofibroblastos por meio das reações de imunistoquímica para anticorpos *anti-actina* foi adequada com relação ao período de atuação destas

células no transcorrer do processo de reparação, sendo que normalmente aparecem em períodos intermediários e desaparecem nos estágios mais avançados (KWON et al., 2006). Apesar destes achados, não foi possível correlacionar a quantidade de miofibroblasto com a contração da ferida. Contudo, o fato da contagem de miofibroblastos ter sido maior para os grupos irrigados com água ozonizada em relação aos grupos controles subsidiou a hipótese de que o ozônio pode interferir na atividade dessas células e conseqüentemente no processo de contração tecidual.

Neste ponto, ressaltamos a importância da concentração do ozônio na água, pois variações da dose podem representar efeitos favoráveis ou prejudiciais, uma vez que o ozônio interfere na quantidade de componentes bioquímicos, cujas expressões também são determinantes para o desempenho dos mesmos. Lembrando que, dependendo da concentração de ozônio, este pode induzir ou desfavorecer a expressão de óxido nítrico, um dos reguladores da apoptose dos miofibroblastos, sendo que tanto o excesso como a falta deste óxido pode acarretar em dano tecidual (SHI et al., 2001; RE et al., 2008). Este fato poderia explicar o porque do GO<sub>3</sub>< ter apresentado na análise imunoistoquímica menor quantidade de miofibroblasto em relação ao GO<sub>3</sub>>.

A análise histomorfológica revelou que, no início, o processo inflamatório foi evidentemente menos expressivo no grupo controle positivo do que no negativo. Esta evidência demonstrou que irrigações de tecidos cruentos podem inicialmente contribuir para a diminuição da inflamação, provavelmente pelo fato de remover resíduos e restringir a presença de microorganismos. Já nos grupos irrigados com água ozonizada, principalmente para o GO<sub>3</sub>>, a expressão das características histológicas da inflamação foi mais intensa e semelhante ao controle negativo,

sugerindo que, neste primeiro momento, o ozônio diluído em água foi capaz de aumentar a resposta inflamatória.

A presença inicial de um processo inflamatório mais intenso para os grupos que empregaram água ozonizada pôde ser facilmente visualizado nos resultados da análise histomorfométrica para o GO<sub>3</sub><, por ter revelado para este grupo maior porcentagem de celularidade e de espaço em branco (respectivamente interpretados como infiltrado inflamatório e edema), mesmo sem diferenças aos outros grupos estatisticamente relevantes. Em especial para a interpretação dos dados desta análise para o GO<sub>3</sub>>, que contrariamente apresentou menores porcentagens daquelas características, devemos observar que este grupo apresentou maior porcentagem de matriz colagênica, o que pode indicar uma formação de colágeno maior no períodos iniciais e explicar as porcentagens anteriormente citadas.

Confirmando aquela interpretação de maior formação de matriz colagênica para o grupo irrigado com água ozonizada na maior concentração no primeiro e segundo períodos estudados, os resultados histomorfológicos revelaram expressão mais intensa da síntese de colágeno para o grupo em questão. Esses fatos indicaram que o ozônio diluído em água possa ter favorecido uma produção de matriz colagênica mais precoce. Citamos também que, que nos mesmos períodos, o estudo quantitativo da marcação do *colágeno tipo-I* pelas reações de imunistoquímica indicou maior expressão deste colágeno para o mesmo grupo.

A associação encontrada entre o uso da água ozonizada com aumento inicial do processo inflamatório, não condiz com a crença encontrada na literatura de que o ozônio teria ação antiinflamatória (BULIÉS, 1996; BULIÉS et al., 1997). Acreditamos que este tipo de citação reflita outras propriedades deste composto que podem causar diminuição clínica da inflamação.

Todavia, no período de sete dias, a correlação entre resposta inflamatória e irrigação se modificou: o  $G_{\text{água}}$  apresentou de forma mais expressiva o processo inflamatório do que  $G_{\text{nada}}$ . Provavelmente, após vários dias de irrigação, o trauma mecânico dificultou a redução do processo inflamatório no grupo controle positivo. Por outro lado, a utilização da água ozonizada deve ter contribuído tal redução, uma vez que ambos grupos irrigados com esta água apresentaram menor resposta inflamatória, muito próxima ao do controle negativo (tanto na análise histomorfológica como na histomorfométrica), fatos estaticamente comprovados para o  $GO_3$ . Dessa forma, em um segundo momento, a atuação do ozônio diluído em água na reparação possivelmente contribuiu para uma redução do processo inflamatório.

Corroboramos com autores, os quais mencionam o ozônio como modulador do processo inflamatório (BOCCI, 2006c; CARDOSO et al., 2000; MADEJ et al., 2007) e/ou estimulador do sistema imune (TOROSSIAN et al., 2004), sendo que desta forma sua utilização acarrete em efeito estabilizador e conseqüentemente regenerador (VALACCHI; BOCCI, 1999). Pode estar envolvido também um estímulo inflamatório como mecanismo de proteção em conseqüência da exposição ao oxidante ozônio, representando uma resposta adaptativa do organismo (VALACCHI et al., 2002, 2003, 2004). Essas hipóteses ajudam a compreender do porque da observação de uma menor resposta inflamatória nos grupos que empregaram água ozonizada no segundo período.

Como a resposta inflamatória é a primeira reação do organismo frente a um dano, esta influencia todas as fases da reparação tecidual (KWON et al., 2006; WASSERBACER; PEREZ-MEZA; CHAO, 2008; WILGUS et al., 2005). Verificamos que, no início do processo de reparação em relação aos controles, os grupos

irrigados com água ozonizada (que apresentavam maior resposta inflamação) demonstraram de forma mais expressiva as características histológicas do tecido de granulação em formação, como maior expressão de vasos neoformados, de fibroblastos jovens, de síntese de colágeno e de matriz extracelular. No entanto, o grupo controle negativo, mesmo apresentando inflamação semelhante aos grupos ozonizados, não demonstrou dados histológicos do tecido de granulação similares a estes, mas, muito inferiores; igualmente para o grupo controle positivo que apresentou menor resposta inflamatória. Assim, esses fatos iniciais em conjunto levam a supor que o ozônio diluído em água possa ter produzido estímulos inflamatórios e reparadores que favoreceram a síntese de tecido.

Durante o transcorrer dos períodos, foi possível identificar características histomorfológicas do tecido neoformado de forma mais expressivas nos grupos que empregaram a água ozonizada. O  $GO_3>$  foi se tornando histologicamente semelhante ao  $G_{nada}$ , sendo que, no final do período de observação, foram estes dois grupos que apresentaram as características microscópicas do processo evolutivo da reparação de forma mais evidente, com expressão intensa de síntese de colágeno e formação de matriz colagênica. Além disso, no período de 14 dias, pela avaliação histomorfométrica, pudemos interpretar que aqueles dois grupos apresentaram uma matriz colagênica mais organizada em comparação aos demais, pelo fato de terem revelado uma baixa porcentagem de matriz juntamente com alta porcentagem de espaço em branco (identificado neste caso como espaços entre as fibras colágenas), semelhanças estatisticamente significantes.

Curiosamente, a análise histomorfométrica identificou que, em várias situações, o grupo  $GO_3<$  foi estatisticamente semelhante ao  $G_{água}$ , como no último período de observação em relação a porcentagens de celularidade e no segundo e

terceiro período de espaço em branco e de matriz colagênica. Devemos lembrar que os resultados desta análise devem ser interpretados pela associação da fase inflamatória e da fibro-produtiva da reparação tecidual.

A coloração do *colágeno tipo-I* pelas reações de imunistoquímica foi regular e bem marcada, com forte expressão em todos os grupos. A disposição das fibras colágenas em alguns campos observados se apresentou ora em feixes finos e paralelos, ora de forma densa ou enovelada, não sendo possível correlacioná-la com o tipo de tratamento realizado. Outros estudos são necessários para se determinar possíveis diferenças de deposição da matriz extracelular, empregando métodos adicionais de avaliação, como a identificação dos outros tipos de colágenos. Contudo, pudemos afirmar que em nenhum dos grupos ocorreu prejuízo na produção colagênica.

Os aspectos histológicos demonstrados neste estudo nos levam a supor que, em feridas limpas de organismo saudáveis, a presença de irrigação, embora inicialmente favorável devido à limpeza da ferida, pode ao longo dos dias prejudicar o processo de reparação pelo trauma mecânico local, por acarretar na permanência da inflamação e na diminuição da formação da matriz extracelular; contrariamente a não irrigação, embora esta situação seja inicialmente desfavorável por aumentar a inflamação. No entanto, quando se empregou água ozonizada, principalmente na maior concentração, a formação tecidual não foi prejudicada, mesmo apresentando aumento inicial da resposta inflamatória. Esses achados sugeriram atuação do ozônio no arranjo tecidual

Existem inúmeras hipóteses de como o ozônio poderia interferir de forma favorável à reparação tecidual, quase todas relacionadas à possibilidade deste oxidante representar o estímulo antioxidante para o organismo (BOCCI, 2004a,

2006c, 2008; LARINI; BOCCI, 2005; RE et al., 2008). Podemos lembrar que já foi comprovada experimentalmente *in vivo* a atuação do ozônio na forma de gás na expressão de citocinas inflamatórias (TOROSSIAN et al., 2004), de enzimas antioxidantes (MADEJ et al., 2007), da heme-oxigenase I, das metaloproteinases (VALACCHI et al., 2002, 2003, 2004), do NF $\kappa$ B e do TGF- $\beta$  (JANIC et al., 2005; LIM et al., 2006), e *in vitro* do IFN- $\gamma$ , do TNF- $\alpha$  e interleucinas (LARINI; BOCCI, 2005).

Independente das hipóteses bioquímicas de como o ozônio em água pode interagir com a resposta celular, a simples presença da maior quantidade de oxigênio, nas feridas irrigadas, proveniente da água ozonizada, com certeza, pode ser favorável à reparação tecidual das mesmas e, provavelmente, pôde estar relacionada aos efeitos terapêuticos observados (FRIES et al., 2005; LIM et al., 2006; OTER; KORKMAZ, 2006; VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005).

Acreditamos que suplementos adicionais de oxigênio interfiram na indução de alguns oxidantes, porque podem ser sinalizadores para eventos oxigênio-dependente, sensíveis ao estado redox, representando um componente fundamental para todos os fatores relacionados à reparação (SEN; ROY, 2008). Lembramos do oxidante peróxido de hidrogênio, cujas ações benéficas já foram comprovadas no processo de reparação e são extremamente dependentes da concentração (SEN et al., 2002; WASSERBACER; PEREZ-MEZA; CHAO, 2008).

O fato da aplicação local da água ozonizada representar aumento na quantidade de oxigênio disponível no tecido superficial pode ter grande utilidade em situações que apresentam déficit daquele composto, como tecido com hipoxia, em feridas crônicas (WILGUS et al., 2005), osteomielite (STEINHART; SCHULZ; MUTTERS, 1999) e em paciente diabético (AL-DALAIN et al., 2001; MARTÍNEZ-SANCHES et al., 2005; RE et al., 2008). Talvez, estas situações e/ou outras que

apresentem algum prejuízo da função celular possam interagir de forma diferente com o ozônio e conduzir a resultados mais favoráveis e mais evidentes, do que no tecido saudável.

Mesmo atuando em animais saudáveis e feridas não infectadas, os nossos resultados demonstraram que a realização diária de irrigação com água ozonizada foi capaz de atuar no processo de reparação, de forma depende da concentração utilizada. Os motivos bioquímicos responsáveis por esta atuação devem ainda ser elucidados por outras pesquisas, bem como se as alterações produzidas representam, na clínica, ações favoráveis ou não àquele processo.

Também não pudemos avaliar se os efeitos biológicos induzidos pelo ozônio diluído em água foram apenas de forma local ou se alcançaram atuações sistêmicas, como já foi comprovado para aplicação do gás ozônio (TOROSSIAN et al., 2004). Igualmente, não pudemos determinar se aqueles efeitos ocorreram apenas durante os minutos da irrigação, quando havia contato da água ozonizada com o tecido cruento, ou se esta pode modificar a função celular por um período longo após sua aplicação, como os relatados por Foucaud et al. (2006).

Não há dúvidas que os efeitos da ozonioterapia estão relacionados à dose do ozônio utilizada, bem como as condições do equilíbrio redox do organismo (BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; BOCCI, 2004a, 2006a, b, c; CATALDO; GENTILINI, 2005; GROOTVELT et al., 2004a, b; TRAVAGLI; ZANARDI; BOCCI, 2006; TRAVAGLI et al., 2007). Embora Bocci (2006c, 2008) relate, apesar das controvérsias, que uma dose segura já esteja estabelecida com relação à aplicação do gás, não há referência na literatura com relação à concentração terapêutica adequada do ozônio na água.

Acreditamos que realmente seja de extrema dificuldade o estabelecimento de uma dose ou janela terapêutica, sendo o balanço redox regulado por inúmeros eventos bioquímicos (HERNÁNDEZ, 2007) e alterado por condições específicas de cada organismo (BALLAS; DAVIDSON, 2001; BOCCI, 2006a; LIM et al., 2006).

Enfatizamos que a concentração de ozônio é sempre responsável pela existência ou não de atuação bioquímica do mesmo, e se esta será benéfica ou prejudicial (BOCCI, 2006b). Conquanto os efeitos tenham sido dependentes da dose de ozônio utilizada, foi possível verificar, analisando os resultados obtidos pela avaliação macroscópica e microscópica, que a água ozonizada nas concentrações e da forma empregadas, não apresentou efeito tóxico ou prejudicial à reparação tecidual.

Embora seja a quantidade de ozônio diluído em água determinante para os efeitos biológicos do mesmo, é impressionante o número de trabalhos científicos que utilizam a água ozonizada sem elucidar o monitoramento da sua concentração (EBENSBERGER POHL; FILIPPI, 2002; ERDÖSI; FILLIP; MEYER, 2005; ESTRELA et al., 2006; ESTRELA et al., 2007; GARDUÑO et al., 1995; KROZER; HALL; ERICSSON, 1999; VELANO et al., 2001). Este fato acarreta em contestação sobre as metodologias empregadas, o que colabora para o não desenvolvimento e para ceticismo da técnica, como já muito citado na literatura (BOCCI, 2004a, 2006c, 2008).

Algumas publicações, como de Arita et al. (2005), Hems et al. (2005), Huth et al. (2006) e Nagayoshi et al. (2004a), especificaram utilização de testes fotométricos ou colorimétricos para determinação da concentração do ozônio na água. Embora estes autores tenham descrito estas concentrações por medidas diferentes, essas variaram entre 0,5 e 5 ppm, intervalo no qual nossas concentrações utilizadas se

encontraram. O teste colorimétrico por nós utilizado revelou-se ser fundamental para o controle desta concentração, uma vez que apenas uma pequena quantidade de ozônio produzido é mantido e incorporado ao fluido. Além disso, este teste apresentou fácil execução, boa precisão e baixo custo.

Em nossa opinião, a aplicação da água ozonizada na boca não apresenta risco relacionado à toxicidade do ozônio quando respirado, fato que seria de difícil controle se o gás fosse empregado, visualizando a segurança do paciente e do profissional. Duvidamos da possibilidade de mecanismo de sucção suficiente para a aplicação do gás de ozônio durante procedimentos cirúrgicos e/ou sob tecido mole e ósseo, como proposto por Stübinger, Saber e Filippi (2006) e realizado por Agrillo et al. (2006, 2007). Acreditamos que para estas aplicações, seria necessário o desenvolvimento de dispositivos capazes de garantir simultaneamente vácuo e sucção naquelas circunstâncias, como propostos para o tratamento de cáries no dente, que é um tecido mineralizado de fácil isolamento e acesso (BAYSAN; LYNCH, 2004; BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; HOLMES, 2003; KRASSE, 2004).

A alta biocompatibilidade da água ozonizada com os tecidos bucais, necessária para sua utilização clínica, já foi comprovada (EBENSBERGER; POHL; FILIPPI, 2002; HUTH et al., 2006), inclusive em ambas concentrações empregadas nesta pesquisa. Estamos de acordo com Filippi (1997a) e Ebensberger, Pohl e Filippi (2002) que a isotonia desta água não representaria desvantagem em comparação ao uso do soro fisiológico.

O ozônio incorporado em água também oferece facilidade de uso clínico devido a sua maior estabilidade quando se apresenta desta forma, o que permiti seu armazenamento até vários dias, desde de que corretamente manipulado (BOCCI, 2004a, b, 2006c; BULIÉS et al., 1997). É importante explanar que, durante o

exercício do método proposto, a produção da água ozonizada por meio do gerador confiável a partir de oxigênio medicinal mostrou-se segura, simples e econômica, não requerendo espaço físico ou instalações adicionais (BOCCI, 2004a, 2006b). Lembramos ainda que para esta produção não há contra indicação relacionada ao risco de ozônio liberado no ar (FILIPPI, 1998).

A ação antimicrobiana do ozônio tem sido seguramente referendada na literatura desde os primórdios da utilização da ozonioterapia (BULIÉS, 1996; BULIÉS et al., 1997; GROOTVELT et al., 2004a; STÜBINGER; SABER; FILIPPI, 2006). A efetividade desta ação do ozônio, na forma de gás e diluído na água, contra muitas bactérias bucais já foi comprovada (ESTRELA et al., 2006; GARDUÑO et al., 1995; NAGAYOSHI et al., 2004a; VELANO et al., 2001), enquanto, contra bactérias organizadas em biofilme ainda é questionada (HEMS et al., 2005; MÜLLER; GUGGNHEIM; SCHMIDLIN, 2007; WALKER et al., 2003).

Como a cavidade bucal é acometida por inúmeras doenças infecciosas, julgamos, como Nagayoshi et al. (2004a) e Velano et al. (2001), que o efeito antimicrobiano da água ozonizada, a torna de grande utilidade em muitas práticas da odontologia. Devido aos métodos empregados, que utilizou feridas limpas de animais jovens e saudáveis, não pudemos analisar ou comprovar tal efeito.

Se além das características já referendadas, como efeito antimicrobiano, ausência de toxicidade e facilidade de uso, a água ozonizada apresentasse também atividades pró-inflamatórias e reparadoras favoráveis à reparação tecidual em determinadas situações clínicas, acreditamos que esta apresentaria importantes indicações no campo de cirurgia buco-maxilo-facial, como havia sugerido Filippi (1997a e 1999b). Porém, divergimos deste autor, quando aconselha, para procedimentos cirúrgicos, o uso da água ozonizada diretamente da unidade de água

do equipamento odontológico, pois, segundo Walker et al. (2003), a desinfecção desta unidade pela ozonização não garante a esterilidade da mesma.

São inúmeras as possibilidades do emprego da água ozonizada no campo da cirurgia, como as já citadas na literatura: para osteotomia durante a exodontia de dentes inclusos (FILIPPI, 1999b), em reimplantes de dentes (EBENSBERGER; POHL; FILIPPI, 2002), na regeneração tecidual guiada, no tratamento de perimplantite (KROZER; HALL; ERICSSON, 1999), em procedimentos para enxertos autógenos (ERDÖSI; FILIPPI; MEYER, 2005) e para anti-sepsia (HUTH et al., 2006). Visualizamos seu uso também em irrigações cirúrgicas e no tratamento de muitas afecções bucais.

É importante lembrar que o emprego do óleo ozonizado na odontologia apresenta características de uso e efeitos semelhantes ao da água ozonizada, como demonstrou os resultados da pesquisa experimental de Sakazaki et al. (2007), que foram muito similares aos nossos.

Diante da pesquisa explanada, nossos resultados puderam identificar que a aplicação do ozônio diluído em água por meio de irrigações cirúrgicas trans e pós-operatórias interferiu no processo de reparação tecidual de organismos saudáveis, de forma dependente da dose, sem produzir efeito tóxico ou prejudicial. Consideramos que esta interferência possa atuar de forma favorável à reparação tecidual dependendo da situação clínica.

Devidos aos indícios da atuação do ozônio diluído em água na reparação tecidual, acreditamos que a utilização da água ozonizada deva ser pesquisada com relação a vários aspectos bioquímicos e clínicos da reparação. Os mecanismos que acarretam em seus possíveis efeitos biológicos, com embasamento na sua concentração, precisam ser elucidados para que a água ozonizada possa ser

utilizada com segurança e para que suas inúmeras indicações terapêuticas possam ser aproveitadas.

## 7 CONCLUSÃO

Esta pesquisa permitiu concluir que o ozônio diluído em água, aplicado por meio de irrigações cirúrgicas:

- não apresentou efeito tóxico ou prejudicial à reparação tecidual;
- interferiu no processo de reparação tecidual, de forma dependente da concentração;
- possibilitou maior redução da área, principalmente quando a concentração de 1ppm foi utilizada, e contribuiu para uma contração tecidual mais regular, quando a concentração empregada foi de 4ppm;
- contribuiu para o aumento inicial da resposta inflamatória e posterior diminuição da mesma, e favoreceu a formação tecidual, principalmente quando a concentração de 4 ppm foi empregada.

## REFERÊNCIAS

Agrillo A, Petrucci MT, Tedaldi M, Mustazza MC, Marino SMF, Gallucci C et al. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. *J Craniofac Surg* 2006;17(6):1080-2.

Agrillo A, Sassano P, Rinna C, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in extractive surgery on patients treated with bisphosphonates. *J Craniofac Surg* 2007;18(5):1068-70.

Al-Dalain SM, Matínez G, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Re L, Giuliani A, et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res* 2001;44(5):391-6.

Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, Okinaga T, Masumi S, Morikawa M, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:206-10.

Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent* 2008;36:104-16.

Ballas CB, Davidson JM. Delayed wound healing in aged rats is associated with increased collagen gel remodeling and contraction by skin fibroblast, not with differences in apoptotic or myofibroblast cell populations. *Wound Repairs and Regeneration* 2001;9(3):223-37.

Batista AD, Mesa MG, Manresa CP, Cepero SM. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes diabéticos tratados con ozonoterapia: informe preliminar. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001;20(1):45-7.

Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent* 2004;17(1):56-60.

Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res* 2000;34(6):498-50.

Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for the therapy of Human Immunodeficiency Virus Infection and several other diseases. *Med Hypotheses* 1996;46:150-4.

Bocci V, Borrelli E, Valacchi G, Luzzi E. Quasi-total-body exposure to an oxygen-ozone mixture in a sauna cabin. *Eur J Appl Physiol* 1999;80:549-54.

Bocci V. How Ozone acts and how it exerts therapeutic effects. In: Lynch E. *Ozone: the revolution in dentistry*. United Kingdom: Quintessence Publishing Books; 2004a. cap.1.1, p. 15-22.

Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm* 2004b;13(1):3-11.

Bocci VA. Comparative clinical studies between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozonotherapy in selected chronic pathologies are urgently needed. *Arch Med Res* 2006a;37:919.

Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006b;216:493-504.

Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy: state of the art. *Arch Med Res* 2006c;37:425-35.

Bocci VA. Can ozonotherapy be performed if the biochemistry of the process cannot be controlled? *Arch Med Res* 2007;38:584-5.

Bocci VA. Why orthodox medicine has not yet taken advantage of ozone therapy. *Arch Med Res* 2008;39:259-60.

Brauner AW. Periodontology: New methods. *Ozone Sci Eng* 1992;14:165-76.

Buliés JCE. Una solución para exposiciones óseas postraumáticas: asociación de injerto de epiplon mayor con ozonoterapia. *Rev Cubana Invest Biomed* 1996;15(2):1-9.

Buliés JCE, Díaz OV, Rauder RS, Valdés YL, García CL. Resultados terapéuticos en la osteoartritis de la rodilla con infiltraciones de ozono. *Rev Cubana Invest Biomed* 1997;16(2):124-32.

Çanakçı CF, Çicek Y, Çanakçı V. Reative oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry* 2005;70(6):619-28.

Cardoso CC, Carvalho JCT, Ovando EC, Macedo SB, Dall'Aglio R, Ferreira LR. Action of ozonized water in preclinical inflammatory models. *Pharmacol Res* 2000;42(1):51-4.

Carletto C, Nicolay JF. Oxidative stress and cutaneous ageing: the 'toxic second messengers' concept and an interesting family of products, 'pseudodipeptides'. *Int J Cosmet Sci* 2000;22:361-70.

Cataldo F, Gentilini L. On the action of ozone on whole bovine blood. *Polym Degrad Stab* 2005;89:527-33.

Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, Chen Z. Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2008a;581:306-14.

Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, Chen Z. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. *J Surg Res* 2008b [Epub ahead of print].

Cotovio J, Onno L, Justine P, Lamure S, Catroux P. Generation of oxidative stress in human cutaneous models following in vitro ozone exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;15:357-62.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflammation and Repair. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins pathologic basis of disease*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.S. Saunders; 1994. cap 3, p. 351-92.

Ebensberger U, Pohl Y, Filippi A. PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for descontamination. *Dent Traumatol* 2002;18:262-6.

Erdösi R, Filippi A, Meyer J. Application of ozone to local bone augmentation procedures in dental implantology. In: *IOA 17<sup>th</sup> World Ozone Congress*. Strasbourg; 2005.

Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human roots canals. *Int Endod J* 2007;40:85-93.

Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Silva JA, Bammann LL. Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. *Braz Dent J* 2006;17(2):134-8.

Feugate JE, Li Q, Martins-Green M. The cxc chemokine cCAF stimulates differentiation of fibroblasts into myofibroblast and accelerates wound closure. *J Cell Biol* 2002;156(1):161-72.

Filippi A. Ozone in oral surgery- current status and prospects. *Ozone Sci Eng* 1997a;19:387-93.

Filippi A. Ozone in room air when using water ozonating equipment in the dental treatment area. *Ozone Sci Eng* 1998;20:251-7.

Filippi A. Ozone is the most effective disinfectant for dental treatment units: results after 8 years of comparison. *Ozone Sci Eng* 1997b;19:527-32.

Filippi A. The disinfecting action of ozonated water and of hydrogen peroxide/silver ions in vitro. *Ozone Sci Eng* 1999a;22:441-5.

Filippi A. The influence of the water heater in dental chairs on the ozone concentration in the water used. *Ozone Sci Eng* 1999b;21:629-33.

Filippi A. Research note: water contamination in conventional and in ozone disinfected dental treatment units after a prolonged period of time between treatment. *Ozone Sci Eng* 2001;23:255-8.

Fisch EA. Die ozontherapie in der Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde [Thesis]. Bonn, Germany: Rheinische Friedrich Wilhems Universität; 1934.

Foucaud L, Bennisroune A, Klestadt D, Laval-Gilly P, Falla J. Oxidative stress induction by short time exposure to ozone on THP-1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;20:101-8.

Fries RB, Wallace WA, Roy S, Kuppusamy P, Bergdall V, Gordillo GM, et al. Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res* 2005;579:172-81.

Garduño MPG, Quijano GIJ, Lara VGL, García NS, Muñoz EH. Efectos del agua ozonificada en la placa dentobacteriana. *Rev ADM* 1995;52(6):305-8.

Gent JF, Triche EW, Holford TR, Belanger K, Bracken MB, Beckett W, et al. Association of low-level ozone and fine particles with respiratory symptoms in children with asthma. *JAMA* 2003;290(14):1859-67.

Gracer RI, Bocci V. Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process? *Med Hypotheses* 2005;65:752-9.

Gregori C, Gayotto MV, Campos AC, Basile, JN. Acidentes e complicações. In: Gregori C, Campos AC. *Cirurgia buco-dento-alveolar*. 2<sup>o</sup> ed. São Paulo: Sarvier; 2004. cap. 14, p. 140-58.

Grootvelt M, Baysan A, Siddiqui N, Sim J, Silwood C, Lynch E. History of clinical applications of ozone. In: Lynch E. *Ozone: the revolution in dentistry*. United Kingdom: Quintessence Publishing Books; 2004a. cap. 1.2, p. 23-30.

Grootvelt M, Silwood C, Sim J, Siddiqui N, Claxson A, Lynch E. Safety aspects regarding the therapeutic applications of ozone and ozonated culinary oils in medicine and dentistry. In: Lynch E. *Ozone: the revolution in dentistry*. United Kingdom: Quintessence Publishing Books; 2004b. cap. 1.3, p. 31-8.

Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2004;18:469-79.

Guerra OC, Cepero SM, Jordán MEM, Vázquez TC. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. *Rev Cuba Estomato* 1997;34(1):21-4.

Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38:22-9.

Hernández FA. To what extent does ozone therapy need a real biochemical control system? Assessment and importance of oxidative stress. *Arch Med Res* 2007;38:571-8.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007;170(6):1807-16.

Hodson N, Swift Jr EJ. Using ozone to treat dental caries. *J Comp* 2007;19(6):303-5.

Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontol* 2003;20(2):106-14.

Huth KC, Sangel B, Jacob FM, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci* 2006;114:435-40.

Janic B, Umstead TM, Phelps DS, Floros J. Modulatory effects of ozone on THP-1 cells in response to SP-A stimulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288(1):317-25.

Kandler B, Maitz P, Ficsher MB, Watzek G, Gruber R. Platelets can neutralize hydrogen peroxide in an acute toxicity model with cells involved in granulation tissue formation. *Bone* 2005;36:671-7.

Krasse B. Can ozone be of value in the medical treatment of dental caries? In: Lynch E. *Ozone: the revolution in dentistry*. United Kingdom: Quintessence Publishing Books; 2004. p. 11-3.

Krozer A, Hall J, Ericsson I. Chemical treatment of machined titanium surfaces: an *in vitro* study. *Clin Oral Impl Res* 1999;10:204-11.

Kwon Y-B; Kim H-W, Roh D-H, Yoon S-Y, Baek R-M, Kim J-Y, et al. Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rats. *J Vet Sci* 2006;7(2):105-9.

Larini A, Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol in Vitro* 2005;19:55-61.

Lim Y, Phung AD, Corbacho AM, Aung HH, Maioli E, Reznick AZ, et al. Modulation of cutaneous wound healing by ozone: differences between young and aged mice. *Toxicol Lett* 2006;160:127-34.

Lincheta LF, Simón RD, Cepero SM, Díaz NL, Duque SM. Solución para la epidermofitosis de los pies en integrantes de las Fuerzas Armadas Revolucionarias. *Rev Cubana Med Milit* 2000;29(2):98-102.

López EG, Martínez AR, Ruiz AOB, García LOR. La ozonoterapia en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. *Rev Cubana Estomatol* 2003;40(2). URL: <http://scielo.pueba.sld.cu/scielo> [2007 dez. 18].

Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D, Franik G, et al. Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. *Inflammation* 2007;30(1-2):52-8.

Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Europ J Pharmacol* 2005;523:151-61.

Matos D, Saad S, Francischi JRO, Barreto EP, Novelli MD. Colonic anastomosis with the biofragmentable ring and manual suture. An experimental and comparative study. *Coloproctol* 1994;16(3):169-73.

Menéndez S, Falcón L, Simón DR, Landa N. Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. *Mycoses* 2002;45(8):329-32.

Moulin V, Laroche S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Vallé CA, Roy M. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors. *J Cell Physiol* 2004;198:350-8.

Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm *in vitro*. *Eur J Oral Sci* 2007;115:77-80.

Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004a;19(4):240-6.

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004b;30(11):778-81.

Oter S, Korkmaz A. Relevance of hyperbaric oxygen to ozone therapy. *Arch Med Res* 2006;37:917-8.

Pereira AMVS. Comparação do efeito da medicação intracanal com pasta HPG e com óleos ozonizado, no tratamento endodôntico de dentes despolpados com lesão periradicular associadas: estudo radiográfico, histológico e histobacteriológico em cães. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia da UFRS; 2002.

Piloto VC, Urrutia ZEA. Efectividade del oleozón en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. *Rev Cubana Estomatol* 2000;37(3):140-5

Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Rad Biol Med* 1995;19(6):935-41.

Re L, Mawsouf MN, Menéndez S, Leon OS, Sánchez G, Hernández F. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res* 2008;39:17-26.

Rodrigues KL, Cardoso CC, Caputo LR, Carvalho JCT, Fiorini JE, Shneedorf JM. Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds. *Inflammopharmacol* 2004;12(3):261-70.

Rodríguez ML, Cepero MS, Perdomo EO. Efectos del ozono en el tratamiento de la gengivoestomatitis herpética aguda. *Rev Cubana Estomatol* 1994;31(1):14-7.

Sakazaki F, Kataoka H, Okuno T, Ueno H, Semma M, Ichikawa A, et al. Ozonated olive oil enhances the growth of granulation tissue in a mouse model of pressure ulcer. *Ozone Sci Eng* 2007;29:503-7.

Schulz G, Stechmiller J. Wound healing and nitric oxide production: too little or too much may impair healing and cause chronic wounds. *Low Extremity Wound* 2006;5(1):6-8.

Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Duprè I, Pinna A, et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J Appl Microbiol* 2001;90(2):279-84.

Sen CK, Khanna S, Babior BM, Hunt TK, Ellison EC, Roy S. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J Biol Chem* 2002;277(36):33284-90.

Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta* 2008;1780(1):1348-61.

Shafer WG, Mine MK, Levy BM. *Tratado de patologia bucal*. 4º ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 1987.

Shi HP, Efron DT, Most D, Barbul A. The role of iNOS in wound healing. *Surg* 2001;130(2):225-9.

Siqueira JF, Rôças IN, Cardoso CC, Macedo SB, Lopes HP. Efeitos antibacterianos de um novo medicamento – o óleo ozonizado – comparados às pastas de hidróxido de cálcio. *Rev Bras Odontol* 2000;57(4):252-6.

Steinhart H, Schulz S, Mutters R. Evaluation of ozonated oxygen in an experimental animal model of osteomyelitis as a further treatment option for skull-base osteomyelitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999;256:153-7.

Stübinger S, Saber R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int* 2006;37(50):353-9.

Tomasek JT, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Molec Cell Bio Nat Rev* 2002;3:349-63.

Torossian A, Ruehlmann S, Eberhart L, Middeke M, Wulf H, Bauhofer A. Pre-treatment with ozonized oxygen (O<sub>3</sub>) aggravates inflammation in septic rats. *Inflamm Res* 2004;53(Suppl 2):122-5.

Travagli V, Zanardi I, Bocci V. A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. *Int J Biol Macromolec* 2006;39:317-20.

Travagli V, Zanardi I, Silviotti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromolec* 2007;41:504-11.

Tylicki L, Rutkowski B. Ozone therapy seems to be safe, but is it really clinically effective? *Int J Artif Organs* 2004;27(8):731-2.

Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediat Inflamm* 1999;8:205-9.

Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Brit J Dermatol* 2005;153:1096-100.

Valacchi G, Pagnin E, Corbacho AM, Olano E, Davis PA, Packer L, et al. In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung e skin. *Free Rad Biol Med* 2004;36(5):673-81.

Valacchi G, Pagnin E, Okamoto T, Corbacho AM, Olano E, Davis PA, et al. Induction of stress proteins and MMP-9 by 0,8ppm of ozone in murine skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:741-6.

Valacchi G, Vliet A, Schock BC, Okamoto T, Obermuller-Jevic U, Cross CE, et al. Ozone exposure activates oxidative stress responses in murine skin. *Toxicol* 2002;179:163-70.

Velano HE, Nascimento LC, Barros LM, Panzeri H. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. *Pesq Odontol Bras* 2001;15(1):18-22.

Veranes XG, Nápoles YN, Contrera H, Luque RF, Blanco CM. Labor de enfermera em la aplicación de la azonoterapia em retinosis pigmentaria. *Rev Cubana Enfermer* 1998;14(2):99-102.

Veranes XG, Nápoles YL, Hechavarría IC, Luque RF, Blanco CM. Resultados de los costos en ozonoterapia. *Rev Cubana Enfermer* 1999;15(2):104-8.

Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(6):3327-32.

Wasserbacer S, Perez-Meza D, Chao R. Hydrogen peroxide and wound healing: a theoretical and practical review for hair transplant surgeons. *Dermatol Surg* 2008;34:745-50.

Wentworth Jr P, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, et al. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science* 2002;298(5601):2195-9.

Wilgus TA, Bergdall VK, Dipietro LA, Oberyszyn TM. Hydrogen peroxide disrupts scarless fetal wound repair. *Wound Repair Regen* 2005;13(5):513-9.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO**  
**PROTOCOLO nº 26/05**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Avaliação do emprego do óleo de girassol ozonizado na reparação óssea de ratos*", de responsabilidade da pesquisadora **Andréia Aparecida Traina**, sob orientação da Professora Doutora **Maria Cristina Zindel Deboni**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 07 de novembro de 2005

Prof. Dr. **CELSO LUIZ CALDEIRA**  
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

## ANEXO B – Análise Estatística

Análise estatística com relação à área da morfometria.

Teste de Wilcoxon

Nível de significância: 5%

Intervalo de confiança: 95%

Grau de liberdade: 3%

Comparação entre $GO_3 >$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	22	24
7	14	19
14	11	14

Comparação entre $GO_3 >$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	12	18
7	14	20
14	12	14

Comparação entre $GO_3 <$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	16	22
7	13	17
14	12	15

Comparação entre $GO_3 <$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	13	12
7	9	11
14	15	12

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3 >$ e $G_3 <$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	12	15
7	16	22
14	14	18

Comparação entre $GO_3 <$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	12
7	9	12
14	11	19

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3 >/GO_3 <$ e $G_{\text{água}}/G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	14	19
7	11	19
14	15	17

(estatisticamente pouco significante)

## ANEXO C – Análise Estatística

Análise estatística com relação ao fator de forma da morfometria.

Teste de Wilcoxon

Nível de significância: 5%

Intervalo de confiança: 95%

Grau de liberdade: 3%

Comparação entre $GO_3>$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	10	15
7	14	20
14	22	14

Comparação entre $GO_3>$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	10	15
7	19	20
14	22	24

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	23	15
7	25	20
14	27	24

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	12	15
7	13	18
14	24	20

Comparação entre $GO_3>$ e $G_3<$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	15
7	14	17
14	23	24

(estatisticamente pouco significativo)

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	15
7	8	22
14	17	24

(estatisticamente pouco significativo)

Comparação entre $GO_3>/GO_3<$ e $G_{\text{água}}/G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	20	20
7	26	30
14	35	32

(estatisticamente pouco significativo)

## ANEXO D – Análise Estatística

Análise estatística com relação à porcentagem de celularidade de histomorfometria.

Teste de Wilcoxon

Nível de significância: 5%

Intervalo de confiança: 95%

Grau de liberdade: 3%

Comparação entre $GO_3>$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	17
7	18	19
14	19	23

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3>$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	13
7	20	21
14	23	22

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	19	18
7	25	21
14	29	31

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	10	10
7	15	16
14	23	23

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3>$ e $G_3<$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	13
7	16	14
14	19	20

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	12
7	9	10
14	19	20

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3>/GO_3<$ e $G_{\text{água}}/G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	21	20
7	27	30
14	33	31

(estatisticamente pouco significante)

## ANEXO E – Análise Estatística

Análise estatística com relação à porcentagem de espaço branco da histomorfometria.

Teste de Wilcoxon

Nível de significância: 5%

Intervalo de confiança: 95%

Grau de liberdade: 3%

Comparação entre $GO_3>$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	12	18
7	16	22
14	15	24

Comparação entre $GO_3>$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	12	14
7	21	18
14	24	22

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	21	18
7	23	22
14	28	26

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	14
7	15	18
14	24	22

Comparação entre $GO_3>$ e $G_3<$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	12	13
7	16	11
14	15	12

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	10	14
7	5	12
14	17	23

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3>/GO_3<$ e $G_{\text{água}}/G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	10	14
7	8	12
14	14	20

(estatisticamente pouco significante)

## ANEXO F – Análise Estatística

Análise estatística com relação à porcentagem de matriz colagênica de histomorfometria.

Teste de Wilcoxon

Nível de significância: 5%

Intervalo de confiança: 95%

Grau de liberdade: 3%

Comparação entre $GO_3>$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	14
7	15	18
14	13	12

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3>$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	10	8
7	15	14
14	12	10

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{água}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	10
7	8	6
14	11	10

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	11	10
7	8	6
14	14	12

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3>$ e $G_3<$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	8	9
7	14	12
14	11	16

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3<$ e $G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	8	12
7	6	8
14	14	18

(estatisticamente pouco significante)

Comparação entre $GO_3>/GO_3<$ e $G_{\text{água}}/G_{\text{nada}}$		
Dias	$T_{\text{calculado}}$	$T_{\text{crítico}}$
2	6	4
7	8	8
14	12	16

(estatisticamente pouco significante)