

Efeitos da ozonioterapia sobre as fibras colágenas e elásticas no reparo cutâneo – Um estudo histomorfométrico em ratos

Effects of ozone therapy on collagen and elastic fibres in skin repair – A histomorphometric study in rats

Isadora de Carvalho Hegouet¹, Sarah Souza Lima², Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado^{3*}

¹Fisioterapeuta formada pela Universidade Federal da Bahia, Mestranda do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos de Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia; ²Bacharel em Saúde pela Universidade Federal da Bahia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos de Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia; ³Doutora em Patologia Humana pelo Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ UFBA, Professora Associada do Instituto de Ciências da Saúde e do Programa de Pós-graduação Processos Interativos de Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA

Resumo

Objetivo: analisar os efeitos da ozonioterapia, sob duas formas de apresentação – gás e óleo ozonizado –, para biomodulação de fibras colágenas e elásticas em ferimentos cutâneos experimentalmente induzidos em ratos. **Metodologia:** foram utilizados 30 ratos Wistar machos, distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: GC (grupo controle), GGO (grupo tratado com gás ozônio) e GOO (grupo tratado com óleo ozonizado). Todos os animais foram submetidos a uma incisão cirúrgica no dorso, após o que os grupos GGO e GOO receberam terapia com ozônio diretamente na lesão, iniciada imediatamente após a cirurgia e continuada até o 3º dia. Metade dos animais foi eutanasiada ao final de cinco dias, enquanto a outra metade após dez dias de experimento. Nos respectivos períodos de avaliação, secções de pele foram obtidas e coradas com Sirius vermelho para análise das fibras colágenas, e Orceína de Weight para o estudo das fibras elásticas. Essas secções de fibras colágenas e elásticas foram sujeitas às análises histomorfométrica e estatística dos dados. **Resultados:** observou-se uma crescente compactação das fibras colágenas em direção à superfície da lesão nos grupos tratados com ozônio. As fibras elásticas, por sua vez, apresentaram-se distribuídas de forma esparsa, com destaque para o 5º dia, no grupo GGO. A presença de colágeno se mostrou estatisticamente significativa no 5º dia do experimento no grupo GGO em relação ao GC ($p=0,016$). As fibras elásticas, exibiram resultado estatisticamente significativo no 5º dia no grupo GGO em relação ao GC ($p=0,016$), bem como, no 10º dia, no GOO em relação ao GC ($p=0,016$). **Conclusão:** durante a fase proliferativa do reparo cutâneo, a ozonioterapia desempenhou um papel biomodulador, pois promoveu um aumento significativo das fibras colágenas e elásticas na matriz extracelular, nos diferentes períodos do estudo. Essa modalidade terapêutica emerge como uma abordagem promissora para o estudo dos processos de cicatrização em diversos tipos de tecidos.

Palavras-chave: Ozônio; ozonioterapia; cicatrização; colágeno; tecido elástico.

Abstract

Objective: to analyse the effects of ozone therapy in two forms of presentation – gas and ozonated oil – for biomodulation of collagen and elastic fibres in experimentally induced skin wounds in rats. **Methodology:** 30 male Wistar rats were randomly distributed into three experimental groups: CG (control group), GOG (group treated with ozone gas) and GOO (group treated with ozonated oil). All animals underwent a surgical incision on the back, after which the GOG and GOO groups received ozone therapy directly into the wound, starting immediately after surgery and continuing until the third day. Half of the animals were euthanised after five days, while the other half after ten days of experiment. During the respective evaluation periods, skin sections were obtained and stained with Sirius red for analysis of collagen fibres and Weight's Orcein for the study of elastic fibres. These collagen and elastic fibre sections were subjected to histomorphometric and statistical data analyses. **Results:** increasing compaction of collagen fibres towards the lesion's surface was observed in the groups treated with ozone. The elastic fibres, in turn, were sparsely distributed, especially on the fifth day, in the GOG group. The presence of collagen in the GOG group in relation to the CG was statistically significant on the fifth day of the experiment ($p=0.016$). The elastic fibres showed a statistically significant result on the 5th day in the GOG group concerning the CG ($p=0.016$) and on the 10th day in the GOO about the CG ($p=0.016$). **Conclusion:** During the proliferative phase of skin repair, ozone therapy played a biomodulatory role, as it promoted a significant increase in collagen and elastic fibres in the extracellular matrix in the different periods of the study. This therapeutic modality emerges as a promising approach for studying healing processes in various types of tissues.

Keywords: Ozone; ozone therapy; healing; collagen; elastic tissue.

INTRODUÇÃO

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e desempenha um papel crucial na integridade estrutural e na funcionalidade de diversos tecidos, tais

Corresponding / Correspondente: Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado – Endereço: Av. Reitor Miguel Clmon, s/n Canela, Salvador, Bahia, Brasil – E-mail: armedrado@ufba.br

como pele, ossos, tendões, cartilagens e vasos sanguíneos. Sua presença confere resistência e flexibilidade a esses tecidos¹. A estrutura molecular do colágeno é altamente organizada e complexa, e consiste em uma cadeia tripla de polipeptídeos que se organizam em uma configuração helicoidal, conhecida como tripla hélice¹. Essa organização proporciona uma base sólida para a matriz extracelular (MEC) dos tecidos, substrato natural para adesão, proliferação e diferenciação celular, além de desempenhar funções essenciais na cicatrização de feridas, na regeneração tecidual e na manutenção da integridade da pele².

Quando ocorre uma lesão tecidual, tanto as fibras colágenas quanto as elásticas, são afetadas, assim como os outros componentes da matriz extracelular. Tal efeito pode ser decorrente de ruptura física das ligações químicas, exposição a estresses mecânicos excessivos, bem como ocorrência de reações químicas ou enzimáticas liberadas como resposta à lesão³. Essas reações podem resultar na geração de espécies reativas de oxigênio que têm potencial para oxidar ou danificar as proteínas. Além disso, enzimas proteolíticas, conhecidas como metaloproteinases da matriz (MMPs), podem ser ativadas, levando ao rompimento das ligações entre as moléculas de colágeno e elastina, de modo a comprometer ainda mais a integridade estrutural dos tecidos afetados^{4,5}.

Nesse contexto, o processo de cicatrização de feridas pode ser considerado como um fenômeno dinâmico, que se desenvolve na matriz extracelular (MEC) e abarca uma série de fases distintas, mas de formas concomitantes. Tais fases são iniciadas pela resposta inflamatória, seguida pela proliferação celular e pela síntese dos componentes estruturais, tais como fibras de colágeno e elásticas, e a fase de maturação ou remodelamento⁶. Com o propósito de otimizar a resposta inflamatória dos tecidos, profissionais da área da saúde têm adotado abordagens terapêuticas biomoduladoras, as quais têm promovido melhora significativa da resposta tecidual frente a diferentes lesões. Entre essas terapias, destaca-se a ozonioterapia⁷.

O ozônio, um gás composto por três átomos de oxigênio, foi descoberto em 1840. Quando estabilizado e associado ao oxigênio, revelou exercer notável atividade antimicrobiana⁸. Pode ser aplicado terapêuticamente como agente biomodulador no tratamento de feridas, com o propósito de acelerar e aprimorar os resultados da cicatrização. Em especial, seu emprego no tratamento de ferimentos e úlceras cutâneas crônicas tem sido citado na literatura, como mostra o estudo de Izadi et al.⁹ (2019), no qual os autores realizaram um ensaio clínico em pacientes portadores de úlceras plantares relacionadas à *Diabetes mellitus*, e constataram melhora qualitativa na cicatrização e aceleração do fechamento das lesões dos pacientes tratados com ozônio. Evidências científicas semelhantes foram compiladas na revisão sistemática publicada por Wen et al.⁸ (2022).

O tratamento com a ozonioterapia no reparo cutâneo pode ser vinculado à regulação de fatores de crescimento, à alta capacidade antioxidante, às modulações hemorreológicas,

à inativação de patógenos, entre outros efeitos benéficos¹⁰. Estudos indicam que a aplicação de ozônio em feridas cutâneas é capaz de inibir a ação de mediadores inflamatórios, além de estimular a biossíntese controlada de prostaglandinas através da sua ação sobre o ácido araquidônico e, conseqüentemente, reduzir o grau da resposta inflamatória no organismo⁸⁻¹¹. No que diz respeito aos efeitos induzidos pelo ozônio na fase proliferativa do reparo tecidual, tem sido destacado o aumento da biossíntese de colágeno e da re-epitelização precoce da ferida em grupos que foram submetidos à ozonioterapia¹².

O presente estudo experimental *in vivo* objetivou avaliar os efeitos da ozonioterapia sobre as fibras colágenas e elásticas na fase proliferativa do reparo cutâneo em ratos, por meio de um estudo histomorfométrico de secções de derme submetidas à ação do ozônio com duas formas de apresentação – ozônio gás e o óleo ozonizado. Tal análise contribuirá para melhor compreensão do potencial terapêutico biomodulador da ozonioterapia sobre os constituintes fibrilares da MEC, no microambiente da lesão, assim como poderá contribuir para a indicação clínica dessa modalidade terapêutica em diferentes contextos patológicos.

METODOLOGIA

O presente estudo teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), registrado com número de protocolo 67/2019.

A amostra do estudo foi constituída de 30 ratos machos *Wistar*. Foi realizada alocação randômica dos animais em três grupos experimentais, cada um com 10 ratos. O Grupo 1, designado como grupo controle (GC), foi tratado com uma solução salina a 9%, sem adição de ozônio. O Grupo 2, denominado Grupo Gás Ozônio (GGO), recebeu a terapia de gás ozônio insuflado na borda da lesão. Por sua vez, o terceiro grupo experimental, o Grupo Óleo Ozonizado (GOO), recebeu o tratamento com o óleo na superfície da lesão.

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico e à ozonioterapia, que teve início após a administração da anestesia com cloridrato de quetamina 10% (Dopalen®, São Paulo, Brasil), a uma concentração de 75 mg/mL e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan®, São Paulo, Brasil) em uma concentração de 5 mg/mL, com a dosagem de 2mg/kg e 3mg/kg, respectivamente. Posteriormente, procedeu-se à tricotomia dorsal, seguida da incisão circular na região dorsal com o auxílio de um bisturi circular metálico *punch*® (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha), com diâmetro de 6mm, para a obtenção de uma ferida uniforme e padronizada¹³.

O gás ozônio foi gerado utilizando-se o aparelho Philozon® (Philozon, Indústria e comércio de geradores de ozônio Ltda., Santa Catarina, Brasil), operando a uma concentração de 13 µg/ml de ozônio, derivado de oxigênio medicinal, com um fluxo constante de 1 L/min.

A mistura de ozônio e oxigênio foi, então, coletada em uma seringa de 4 ml. Por meio de uma agulha de insulina, 1 ml do gás foi administrado uniformemente em quatro pontos ao redor da lesão, correspondentes aos quatro vértices diametrais da ferida. Esse procedimento foi repetido durante três dias consecutivos, após a cirurgia.

O óleo de girassol ozonizado a 100% (Philozon Indústria e Comércio de Geradores de Ozônio Ltda., Santa Catarina, Brasil) foi aplicado em toda a superfície da lesão durante três dias consecutivos, utilizando-se uma pipeta graduada, com um volume final de 50 μ L.

Os animais foram submetidos às modalidades de ozonioterapia conforme previamente determinado, nos dias um, dois e três do período experimental. Em cada grupo, cinco animais foram sacrificados no quinto dia após a cirurgia, seguidos pela outra metade no décimo dia, por meio de uma câmara de gás carbônico para procedimento de eutanásia.

Secções de pele correspondentes à área da lesão foram retiradas e processadas histologicamente, após fixação em formaldeído, por um período mínimo de 18 horas. Os cortes histológicos foram corados com Sirius vermelho para análise da área do colágeno, e Orceína de Weigert para o estudo das fibras elásticas.

As secções de cada espécime foram analisadas e fotografadas por meio do *software* Motic Images Advanced 3.0[®] (Motic China Group CO. LTDA), a fim de avaliar a área correspondente às fibras colágenas e elásticas. Estabeleceu-se uma área padrão para a análise de todos os casos, compreendendo 100 μ m² na região central da ferida. Ao final, foram realizadas cinco micrografias de cada secção tecidual. A área do colágeno em secções de derme coradas com Sirius vermelho foi mensurada em μ m², e foi

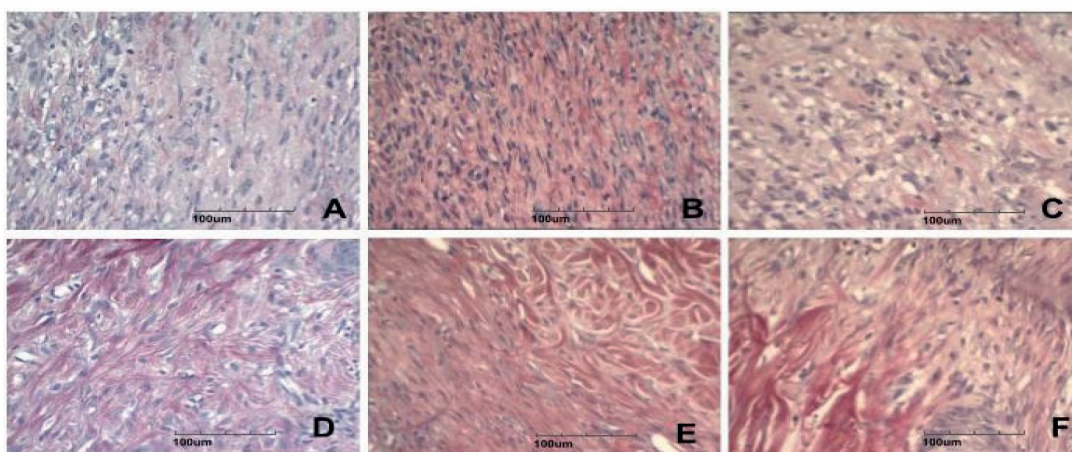
estabelecido um valor, expresso em mediana, para cada animal do experimento. As fibras elásticas foram avaliadas semiquantitativamente, de acordo com os critérios estabelecidos por Pugliese et al.¹³ (2003), em que 0 representa ausência de fibras, 1 indica grau leve, 2 representa grau moderado e 3, grau intenso de fibras elásticas.

Foi realizada a análise dos dados a mostrais e dos valores de área de colágeno. As categorias de fibras elásticas, conforme foi indicado no parágrafo anterior¹³, foram expressas em medianas \pm intervalos de confiança, e apresentadas através de estatística descritiva. Os dados foram analisados pelo *software* R (versão 4.3.2, for Windows[®]). Foi empregada a análise de variância (ANOVA) para comparações entre grupos e o Teste t de Student não paramétrico, para um nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

No 5^o dia do período pós-operatório, nas secções teciduais dos animais do GC coradas com Sirius vermelho, foi observada derme composta por tecido de granulação típico, que apresentava fibras colágenas delgadas, distribuídas de forma mais organizada nas proximidades da hipoderme (Figura 1A). Nesse grupo, as fibras elásticas foram representadas em magenta, nas secções coradas com Orceína de Weigert, e se encontravam esparsamente dispostas nos bordos inferiores da área do ferimento, na base do tecido de granulação (Figura 2A). Aspectos morfológicos semelhantes foram observados nos grupos experimentais GGO e GOO (Figura 1B, 1C, 2B e 2C). Nesses grupos, as fibras colágenas se apresentavam mais espessas, e as fibras elásticas foram visualizadas nos mesmos locais descritos no GC.

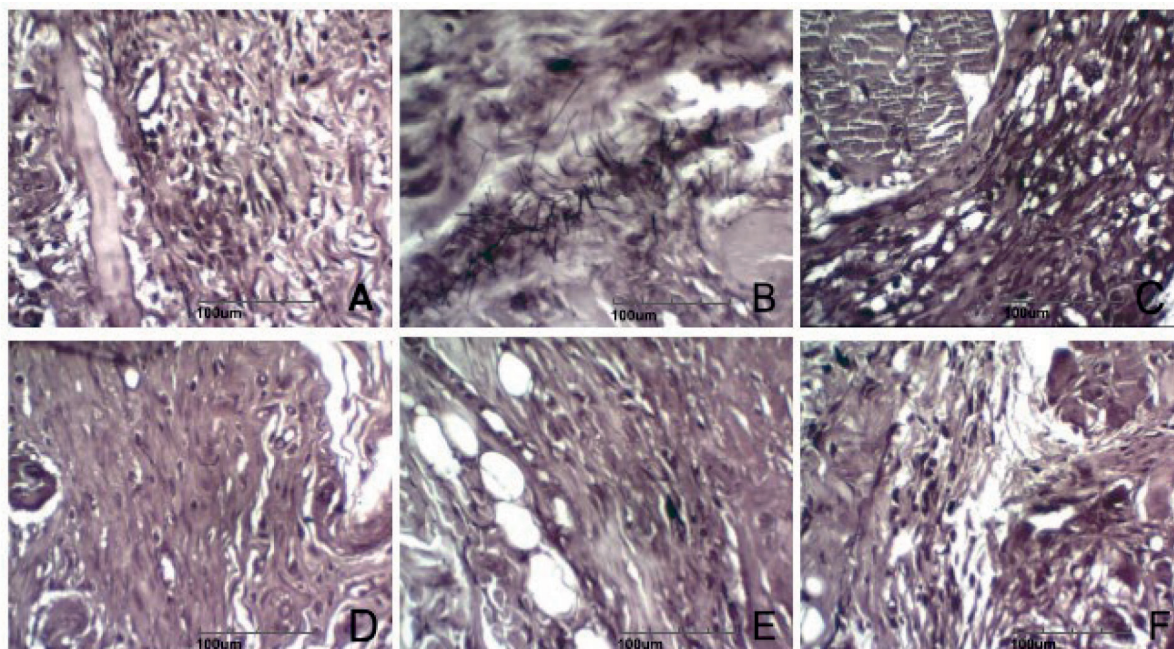
Figura 1 – Fotomicrografias ilustrativas das fibras colágenas coradas por Sirius Vermelho



Legenda – Presença de fibras colágenas representadas por fotomicrografias de secções histológicas de pele coradas com Sirius Vermelho, correspondentes à região dos ferimentos cutâneos padronizados, que exibem arranjo frouxamente organizado no 5^o dia, na derme de todos grupos experimentais. Aos 10 dias do período pós-operatório, observar a crescente compactação das fibras e o padrão organizacional ainda aleatório em GC, e mais organizado em GGO e GOO. Sirius vermelho. A – Grupo Controle (GC), 5 dias; B – Grupo Gás Ozônio (GGO), 5 dias; C – Grupo Óleo Ozonizado (GOO), 5 dias; D – Grupo Controle (GC), 10 dias; E – Grupo Gás ozônio (GGO), 10 dias; F – Grupo Óleo Ozonizado (GOO), 10 dias.

Fonte: autoria própria

Figura 2 – Fotomicrografias ilustrativas das fibras elásticas coradas por Orceína de Weigert



Legenda – Presença de fibras elásticas esparsamente distribuídas, coradas em magenta, representadas por fotomicrografias de secções de derme coradas com Orceína, correspondentes à região dos ferimentos cutâneos padronizados, com padrão organizacional semelhante para os grupos experimentais em ambos os períodos do estudo. Orceína de Weigert. A- Grupo Controle (GC), 5 dias; B - Grupo Gás Ozônio (GGO), 5 dias; C - Grupo Óleo Ozonizado (GOO), 5 dias; D- Grupo Controle (GC), 10 dias; E - Grupo Gás ozônio (GGO), 10 dias; F - Grupo Óleo Ozonizado (GOO), 10 dias.

Fonte: autoria própria

Aos 5 dias de experimento, durante a análise intragrupos, a área do colágeno aumentou nos grupos GC e GOO, mas sem significância estatística, com $p > 0,05$ (Tabela 1). Nesse período, a área total de colágeno foi significativamente maior no GGO em relação a GC, e correspondeu a $27,517 \mu\text{m}^2$, com $p = 0,016$ (Tabelas 1 e 3).

Na análise intragrupos da variável fibras elásticas, observou-se que o GOO e o GC exibiram diferença estatisticamente significativa entre o 5º e o 10º dia do experimento, com $p = 0,003$ e $p = 0,016$, respectivamente (Tabela 2). Na comparação intergrupos, as medianas dos grupos GGO e GOO exibiram valor igual a 1(1-1; 0-1, respectivamente), ao passo que, no GC, não foram visualizados esses elementos fibrilares. Contudo, essa diferença foi estatisticamente significativa apenas na comparação entre GC e GGO, com $p = 0,016$ (Tabelas 2 e 4).

Tabela 1 – Análise intragrupos com valores de medianas e intervalos interquartis correspondentes à área de colágeno em pele de ratos, em 5 e 10 dias do período pós-operatório

Grupo	5º dia	10º dia	p-valor
GC	20,603 (16,988 - 23,159)	25,713 (20,75 - 27,628)	0,316
GGO	27,517 (18,852 - 28,485)	26,067 (20,293 - 28,895)	0,985
GOO	22,582 (21,468 - 24,232)	23,717 (18,83 - 27,472)	0,392

*Teste T de student, com nível de significância de $p < 0,05$.

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 2 – Análise intragrupos com valores de medianas e intervalos interquartis correspondentes às fibras elásticas em pele de ratos, em 5 e 10 dias do período pós-operatório

Grupo	5º dia	10º dia	p-valor
GC	0 (0 -0)	1 (1 -1)	0,016*
GGO	1 (1 -1)	1 (1 -1)	0,373
GOO	1 (0 -1)	2 (2 -2)	0,003*

*Teste T de student, com nível de significância de $p < 0,05$.

Fonte: dados da pesquisa

No 10º dia do período pós-operatório, nas secções teciduais dos animais pertencentes a GC coradas com Sírius vermelho, foi observada crescente compactação de fibras colágenas em direção à superfície da lesão. Os feixes se apresentavam desorganizados, embora mais espessos (Figura 1D). Nos grupos experimentais tratados com ozônio, as fibras colágenas apresentavam feixes mais densos e organizados (Figura 1E e 1F). No GC, as fibras elásticas foram visualizadas em maior grau em relação ao 5º dia, e ainda dispostas nos bordos inferiores da área do ferimento (Figura 2D). Aspectos morfológicos semelhantes foram observados nos grupos experimentais tratados com ozônio, embora a presença das fibras elásticas no GOO tenha sido moderada, em comparação ao GC e GGO

(Figura 2E e 2F).

A área total de colágeno, nesse período, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos analisados, com $p > 0,05$ (Tabela 3).

Na análise semiquantitativa das fibras elásticas, ao se observarem as medianas dos grupos GGO e GC, que exibiram valor igual a 1(1-1; 1-1, respectivamente), em comparação ao grupo GOO, foi possível visualizar aumento desses elementos fibrilares com mediana igual a 2(2-2), nesse último grupo. Desse modo, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas na comparação entre os grupos GC e GOO, com $p = 0,016$ (Tabela 4).

Tabela 3 – Análise intergrupos da variável área de colágeno com valores descritos que expressam o nível de significância estatística, em 5 e 10 dias do período pós-operatório

Grupo	p-valor no 5º dia	p-valor no 10º dia
GC e GGO	0,016*	0,894
GC e GOO	0,512	0,780
GGO e GOO	0,884	0,743

*Teste Anova e teste T de student foram aplicados associando os diferentes grupos experimentais, com nível de significância de $p < 0,05$. Abreviaturas: GC – Grupo controle; GGO – Grupo experimental Gás ozônio; GOO – Grupo experimental Óleo Ozonizado.

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 4 – Análise intergrupos da variável fibras elásticas com valores descritos que expressam o nível de significância estatística, em 5 e 10 dias do período pós-operatório

Grupo	p-valor no 5º dia	p-valor no 10º dia
GC e GGO	0,016*	0,373
GC e GOO	0,177	0,016*
GGO e GOO	0,177	0,070

*O Teste Anova e teste T de Student foi aplicado associando o GC com os grupos experimentais, com nível de significância de $p < 0,05$. Abreviaturas: GC – Grupo controle; GGO – Grupo experimental Gás ozônio; GOO – Grupo experimental Óleo Ozonizado.

Fonte: dados da pesquisa.

DISCUSSÃO

A ozonioterapia tem sido objeto de investigação de inúmeros estudos científicos em virtude de seus potenciais benefícios. Os efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios e antioxidantes têm sido corroborados, especialmente em relação ao reparo tecidual¹⁴. Há relato, na literatura, de que a redução da atividade microbiana e a biomodulação das respostas inflamatórias promovem uma re-epitelização mais rápida e eficaz do ferimento tratado com ozônio¹⁵. Diante do crescente número de evidências acerca da eficácia da ozonioterapia em diferentes contextos biológicos, o presente estudo objetivou analisar os efeitos oriundos da terapia com gás e óleo ozonizados sobre as fibras colágenas e elásticas no reparo cutâneo de ratos, por meio de um modelo experimental de cicatrização cutânea já validado na literatura¹³.

Na atual análise, constatou-se que as alterações mais significativas ocorreram no 5º. dia da cicatrização cutânea, em especial, nos grupos tratados com ozônio. O GGO apresentou área de fibras colágenas significativamente maior, quando comparado aos demais grupos experimentais nesse período. Esse resultado corrobora aqueles apresentados nos estudos de Soares et al.¹⁶ (2019), Aktas et al.¹⁷ (2023), Pires et al.¹² (2021), e Ginel et al.¹⁸ (2021), nos quais foi relatada melhora do aspecto clínico e das variáveis histológicas no processo de cicatrização de feridas cutâneas após a utilização da ozonioterapia local. Em particular, no estudo de Soares et al.¹⁶ (2019), os autores investigaram os efeitos da administração subcutânea de gás ozônio no reparo de pele, em ratos. Vinte e quatro animais foram alocados em dois grupos experimentais: controle e tratado com ozônio. No grupo que recebeu a ozonioterapia experimental, os animais foram tratados com injeções de gás ozônio em quatro bordos do ferimento, e foram avaliados no 7º e no 14º dia do experimento. Os resultados obtidos demonstraram que, em ambos os dias avaliados, as feridas tratadas com ozônio apresentaram redução de células inflamatórias, aumento do número de fibroblastos e maior biossíntese de colágeno na área tratada, em ambos os períodos de análise histomorfométrica correspondentes aos dias de óbito dos animais. No entanto, os achados desses autores divergem daqueles apresentados no presente estudo, no sentido de que se perpetuaram até o 14º dia. Provavelmente, essa aparente discrepância pode estar relacionada às diferentes doses utilizadas, uma vez que Soares et al.¹⁶ (2019) relataram o uso de 0,1mL do gás, ao passo que, em nosso estudo, foi empregado 1mL. Tem sido hipotetizado, na literatura, que o efeito do ozônio é dose-dependente, e que volumes menores podem induzir efeitos mais duradouros no tecido¹⁹.

A complexa relação entre o processo de reparo tecidual e a ozonioterapia tem sido objeto de extensa investigação na literatura científica^{20,21}. Conforme já foi relatado em estudos prévios, o ozônio estimula as atividades biológicas dos fibroblastos, de células endoteliais e queratinócitos, possivelmente por meio da sinalização celular via Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), proteína que está diretamente ligada à re-epitelização e angiogênese²². Em relação ao uso do óleo ozonizado para fins cicatriciais, Pai, Gagangras, Kulkarni, Majumdar²³ (2014) documentaram as propriedades anti-inflamatórias e bioestimuladoras desse agente terapêutico, com aplicação do óleo ozonizado por 12 dias. Resultados semelhantes foram relatados por Aktas et al.¹⁷ (2023), em seu estudo experimental, no qual foi realizada uma análise de feridas cutâneas em ratos, com utilização do óleo ozonizado por 21 dias. Os resultados indicaram uma contração significativa das feridas, bem como menores níveis de inflamação nos grupos tratados com ozônio.

Na investigação realizada, ao se analisar a variável área de colágeno, no GOO, observou-se uma mediana superior apenas no quinto dia do experimento, porém sem signifi-

cância estatística nesse período. Esses achados contrastam com os de Xiao et al.²⁴ (2017) e Ginel et al.¹⁸ (2021), que avaliaram a eficácia do óleo ozonizado em lesões cutâneas de ratos e tartarugas. Ambos os estudos relataram resultados promissores, ao compararem o grupo controle com o experimental submetido à ação do óleo ozonizado. No grupo tratado, verificou-se uma redução significativa no tamanho das feridas, um aumento na migração de fibroblastos, e o estímulo à síntese do colágeno tipo I, à proteína ACTA2 e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β 1). Além disso, houve maior proliferação de macrófagos e linfócitos, bem como aumento na deposição e remodelação das fibras de colágeno nas feridas tratadas com ozônio, a partir do 21º dia do experimento. A partir de tais resultados, é importante notar que, nos estudos mencionados, o período de aplicação do óleo ozonizado foi de 12 e 7 dias, respectivamente. Portanto, pode ser necessário um período maior de aplicação do óleo ozonizado para potencializar seu efeito cicatricial, bem como um tempo de experimento mais prolongado para evidenciar resultados mais significativos. Contudo, em nosso estudo, mesmo com a aplicação do óleo ou gás ozonizado apenas por três dias consecutivos, após a indução do ferimento cutâneo, foram constatados efeitos biológicos estatisticamente significativos.

Durante o reparo tecidual, ocorre transição de células do sistema imunológico, como os macrófagos, que migram para o tecido com a finalidade de eliminar patógenos e restaurar o tecido danificado. Essa fase é crucial na transição gradativa para as próximas fases, representadas por acentuação dos fenômenos proliferativos e remodelamento da matriz extracelular²⁵. Nesse período, tem início a elastogênese, caracterizada pela crescente biossíntese de fibras elásticas no interstício, que desempenha um papel fundamental na restauração da rede de fibras elásticas funcionais^{26,27}. Esse processo confere propriedades mecânicas ao tecido cicatricial, essenciais para a restauração de sua funcionalidade, principalmente na pele após a lesão²⁸. A partir dos resultados observados no presente estudo, pode-se afirmar que o ozônio, independentemente de sua forma de aplicação, estimulou a biossíntese das fibras elásticas no modelo experimental utilizado. Esse resultado foi evidenciado de forma estatisticamente significativa, pois se demonstrou o alcance de valores de medianas superiores na graduação das fibras elásticas no quinto dia de exposição ao gás ozônio e, no décimo dia, no grupo submetido à terapia com óleo. Nesse sentido, o presente estudo é o primeiro a destacar essa ação precoce no reparo estimulada pelo ozônio. Contudo, apresenta uma limitação na interpretação dos resultados, uma vez que se limitou a analisar essa variável aos 5 e 10 dias, período relativamente precoce para visualização de novas fibras elásticas na pele. Assim, os autores sugerem a realização de estudos que contemplem um maior período de tempo de análise da cicatrização, uma vez que a elastogênese constitui um processo biológico mais demorado, com evidente

aumento de fibras elásticas um pouco mais tardio, do ponto de vista temporal²⁹.

Embora não tenham avaliado especificamente as fibras elásticas, Hesham et al.³⁰ (2023) observaram que o óleo ozonizado induziu maior grau de proliferação de fibroblastos e biossíntese de colágeno ao final de seu experimento, no 28º dia. Sabe-se que as fibras elásticas são sintetizadas por fibroblastos funcionalmente ativos. Dessa forma, em função dos resultados de Hesham et al.³⁰ (2023), Ginel et al.¹⁸ (2021) e Pai, Gagangras, Kulkarni, Majumdar²³ (2014), os quais demonstraram aumento da proliferação de fibroblastos sob influência do ozônio, seria possível hipotetizar uma correlação entre tais células e o aumento da biossíntese das fibras elásticas. Nesse sentido, faz-se necessária a realização de estudos com períodos de avaliação ainda mais prolongados. Adicionalmente, a observação de um valor de mediana significativo para fibras elásticas no décimo dia de tratamento com óleo ozonizado, no presente estudo, pode ser atribuída ao maior tempo de contato do óleo com o tecido, em comparação com o gás ozônio, que é volátil. Assim, a permanência do óleo sobre a superfície da lesão permitiria uma liberação gradual e prolongada do ozônio, além de favorecer a sua interação com os componentes teciduais.

CONCLUSÃO

O presente estudo histomorfométrico em ratos permitiu avaliar os efeitos da ozonioterapia sobre as fibras colágenas e elásticas na fase proliferativa do reparo cutâneo. Os grupos experimentais submetidos ao tratamento biomodulador com ozônio, em forma de gás ou de óleo ozonizado, apresentaram resultados estatisticamente significativos no tocante à presença de fibras colágenas e elásticas, quando comparados ao grupo controle, nos diferentes períodos do estudo.

REFERÊNCIAS

1. Shenoy M, Abdul NS, Qamar Z, Bahri BMA, Al Ghalayini KZK, Kakti A. Collagen Structure, Synthesis, and Its Applications: A Systematic Review. *Cureus*. 2022 May 9;14(5): e24856. doi: <https://doi.org/10.7759/cureus.24856>
2. Wang H. A Review of the Effects of Collagen Treatment in Clinical Studies. *Polymers*. 2021 Nov;13(22):3868. doi: <https://doi.org/10.3390/polym13223868>
3. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering*. 2021 May 1;8(5):63. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>
4. Singh D, Rai V, K Agrawal D. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol Cardiovasc Med*. 2023;7(1):5-16. doi: <https://doi.org/10.26502/fccm.92920302>
5. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *International J Mol Sci*. 2019 Apr 12;20(8):1811. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20081811>
6. Wang H. A Review of the Effects of Collagen Treatment in Clinical Studies. *Polymers* 2021 Nov 9;13(22):3868. doi: <https://doi.org/10.3390/polym13223868>

7. Cascini F, Franzini M, Andreoli A, Manzotti A, Cadeddu C, Quaranta G, et al. Use of oxygen-ozone therapy to improve the effectiveness of antibiotic treatment on infected arthroplasty: protocol for a superiority, open-label, multicentre, randomised, parallel trial. *BMJ open*. 2024 Jan 4;14(1):e076739. doi: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-076739>
8. Wen Q, Liu D, Wang X, Zhang Y, Fang S, Qiu X, et al. A systematic review of ozone therapy for treating chronically refractory wounds and ulcers. *Int Wound J*. 2022 May; 9(4):853-70. doi: <https://doi.org/10.1111/iwj.13687>
9. Izadi M, Kheirjou R, Mohammadpour R, Aliyoldashi MH, Moghadam SJ, Khorvash F, et al. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. *Diabetes Metab Syndr: Clin Res Rev*. 2019 Jan 1;13(1):822-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.11.060>
10. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound J*. 2018 Mar 13;15(4):633-44. doi: <https://doi.org/10.1111/iwj.12907>
11. Liu L, Zeng L, Gao L, Zeng J, Lu J. Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. *Int Wound J*. 2023 Aug;20(6):2376-85. doi: <https://doi.org/10.1111/iwj.14060>
12. Pires JR, Karam AM, Garcia VG, Ribeiro FS, Pontes AEF, Andrade CR de, et al. Effect of systemic ozone therapy as a biomodulator of tissue regeneration and inflammatory response in rats. *Rev odontol UNESP*. 2021;50:e20210046. doi: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.04621>
13. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR de A, Andrade Z de A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2003 Dec;17(4):307-13. doi: <https://doi.org/10.1590/s1517-74912003000400003>
14. Kumar A, Srivastava A, Sah N, Sah S, Nair VIN, Das A, et al. Evidence-based effectiveness of Ozone therapy in the treatment for oral lichen planus - A systematic review. *Natl J Maxillofac Surg*. 2024;15(1):18-22. doi: https://doi.org/10.4103/njms.njms_20_23
15. Wen Q, Liu D, Wang X, Zhang Y, Fang S, Qiu X, et al. Effects of ozone for treating chronically refractory wounds and ulcers: A protocol for systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicine*. 2020 May 29;99(22):e20457. doi: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000020457>
16. Soares CD, Morais TML, Araújo RMFG, Meyer PF, Oliveira EAF, Silva RMV, et al. Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats. *Growth Factors*. 2019 Mar 4;37(1-2):95-103. doi: <https://doi.org/10.1080/08977194.2019.1643339>
17. Aktas S, Ozsunar Y, Ogut S, Gokce S, Tataroglu C. Comparative Efficacy of Red Beetroot Extract and Ozonated Olive Oil on Wound Healing in Rats. *J Coll Physician Surg Pak: JCPSP*. 2023 Dec 1;33(12):1385-9. doi: <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2023.12.1385>
18. Ginel PJ, Negrini J, Guerra R, Lucena R, Ruiz-Campillo MT, Mozos E. Effect of topical ozonated sunflower oil on second intention wound healing in turtles: a randomised experimental study. *J Vet Sci*. 2021 Mar;22(2): e27 doi: <https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e27>
19. Cisterna B, Costanzo M, Maria Assunta Lacavalla, Mirco Galiè, Angelini O, Tabaracci G, et al. Low Ozone Concentrations Differentially Affect the Structural and Functional Features of Non-Activated and Activated Fibroblasts In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 20;22(18):101333. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms221810133>
20. Pereira-Silva M, Hadad H, de Jesus LK, de Freitas Santana Oliveira ME, de Almeida JM, Nímia HH, et al. Ozone therapy effect in medication-related osteonecrosis of the jaw as prevention or treatment: microtomographic, confocal laser microscopy and histomorphometric analysis. *Clin Oral Invest*. 2024 Feb 16;28(2):151. doi: <https://doi.org/10.1007/s00784-024-05547-z>
21. Růžička J, Grajciarová M, Vištejnová L, Klein P, Tichánek F, Tonar Z, et al. Hyperbaric Oxygen Enhances Collagen III Formation in Wound of ZDF Rat. *Physiol Res*. 2021 Oct 31;787-98. doi: <https://doi.org/10.33549/physiolres.934684>
22. Romary DJ, Landsberger SA, Bradner KN, Ramirez M, Leon BR. Liquid ozone therapies for the treatment of epithelial wounds: A systematic review and meta-analysis. *Int Wound J*. 2023 Apr; 20(4):1235-52 doi: <https://doi.org/10.1111/iwj.13941>
23. Pai SA, Gagangras SA, Kulkarni SS, Majumdar AS. Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. *Ind J Pharm Sci*. 2014;76(1):87-92
24. Xiao W, Tang H, Wu M, Liao Y, Li K, Li L, et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biosci Rep*. 2017 Nov 9;37(6):BSR20170658. doi: <https://doi.org/10.1042/bsr20170658>
25. Valacchi G, Zanardi I, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Sticozzi C, et al. Ozonated oils as functional dermatological matrices: Effects on the wound healing process using SKH1 mice. *Int J Pharm*. 2013 Dec 1;458(1):65-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.039>
26. Zhang X, Alanazi YF, Jowitt TA, Roseman AM, Baldock C. Elastic Fibre Proteins in Elastogenesis and Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 7;23(8):4087. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23084087>
27. Shin SJ, Yanagisawa H. Recent updates on the molecular network of elastic fiber formation. *Essays Biochem*. 2019 Sep;63(3):365-76. doi: <https://doi.org/10.1042/ebc20180052>
28. Gardeazabal L, Izeta A. Elastin and collagen fibers in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol*. 2024 Mar 1;33(3):e15052. doi: <https://doi.org/10.1111/exd.15052>
29. Baumann L, Bernstein EF, Weiss AS, Bates D, Humphrey S, Silberberg M, et al. Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthet Surg J Open Forum*. 2021 May 14;3(3):ojab019. doi: <https://doi.org/10.1093/asjof/ojab019>
30. Hesham A, Abass M, Abdou H, Fahmy R, Rashad MM, Abdallah AA, et al. Ozonated saline intradermal injection: promising therapy for accelerated cutaneous wound healing in diabetic rats. *Front Vet Sci*. 2023;10:1283679. doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1283679>

Submetido em: 26/06/2024

Aceito em: 15/08/2024