



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ODONTOLOGIA

PAULO BADARÓ DE SOUZA

**AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS SOB
EFEITO DE TERAPIAS BIOMODULADORAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Salvador

2020

PAULO BADARÓ DE SOUZA

**AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS SOB
EFEITO DE TERAPIAS BIOMODULADORAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* de Mestrado Profissional em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Odontologia. Área de contratação: Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Teixeira Marchionni

Co-orientadora: Prof. Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

Salvador

2020

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

S719 Souza, Paulo Badaró de
Avaliação termográfica de feridas cutâneas de ratos sob efeito de terapias biomoduladoras. / Paulo Badaró de Souza. – 2020.
49f.: 30cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Teixeira Marchionni
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

Mestre em Odontologia.

Inclui bibliografia

1. Cicatrização. 2. Ozônio. 3. Lazer. 4. Terapia com laser de baixa potência. I. Marchionni, Antônio Márcio Teixeira. II. Avaliação termográfica de feridas cutâneas de ratos sob efeito de terapias biomoduladoras.

CDU: 616.8-009.7

PAULO BADARÓ DE SOUZA

“COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DA OZONIOTERAPIA E DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS: uma revisão sistemática”

Dissertação apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Salvador, 31 de julho de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Me. Marcia Maria Peixoto Leite
Mestre em Medicina e Saúde
Universidade Federal da Bahia, UFBA



Profa. Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado
Doutora em Patologia Humana
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP



Profa. Dra. Silvia Regina de Almeida Reis
Doutora em Odontologia
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Esta obra foi fruto do esforço de um filho que é muito amado e dedicado à sua família. De um irmão que se inspira no filho mais velho para fazer tudo da melhor forma possível e que vê em sua irmã o lado doce e difícil de se colocar no lugar do outro. De um namorado dedicado que tenta se fazer presente nos detalhes sutis e prazerosos que a vida proporciona. De um tio apaixonado que é capaz de largar tudo para ficar com seus sobrinhos. De um neto que aprendeu muito através dos relatos de seus antepassados. De um amigo que encontrou uma forma mais leve de construir a vida através do companheirismo de pessoas boas. De um aluno e colega de trabalho e que cumpria suas metas e se desafiava a cada etapa de crescimento. De um cirurgião dentista que exerce sua profissão em uma cidade do interior do estado da Bahia que não mede esforços para buscar conhecimento e aperfeiçoar a técnica para tratar seus semelhantes. Por todos vocês que compreenderam o momento que eu passava deixo o meu sincero agradecimento e espero muito retribuir através do conhecimento adquirido.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Conflito de interesse: Os autores declaram não ter conflito de interesse de qualquer espécie.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao apoio de infra-estrutura provido pela Faculdade Adventista da Bahia.

Agradeço ao orientador professor Dr. Márcio Marchionni por todo ensinamento durante o trabalho. Pela dedicação e carinho que tem pela Odontologia e pela docência.

Agradeço à professora Dr^a Alena Peixoto Medrado por toda sua delicadeza em todos os momentos que se dispôs a ensinar. Por sua postura firme e detalhista diante de um trabalho tão complexo e enriquecedor.

Aos acadêmicos Carla Barreto, Taise Andrade e Daniel Adrian pela contribuição valiosíssima durante as pesquisas. Que tenham muito sucesso na vida profissional.

Aos professores do mestrado, por dividirem os conhecimentos e experiências profissionais sobretudo na docência.

*“O verdadeiro homem mede a sua força
quando se defronta com o obstáculo.”*

Antoine de Saint-Exupéry

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de Onda
AsGaAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm ²	Centímetro quadrado
FADBA	Faculdade Adventista da Bahia
J	Joule
Kg	Quilo
L	Volume
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation – Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
mg	Miligrama
min	Minuto
mW	micro Watt
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
W	Watt(s)
µg	Micrograma

SUMÁRIO

	MANUSCRITO I - ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA DA OZONIOTERAPIA E DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	8
	RESUMO.....	9
	ABSTRACT.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	METODOLOGIA.....	13
3	RESULTADOS.....	15
4	DISCUSSÃO.....	19
5	CONCLUSÕES.....	22
	MANUSCRITO II - AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS SOB EFEITO DE TERAPIAS BIOMODULADORAS.....	25
	RESUMO.....	26
	ABSTRACT.....	27
1	INTRODUÇÃO.....	28
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.1	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	30
2.2	Amostra.....	30
2.3	Procedimentos cirúrgicos e utilização das terapias biomoduladoras.....	30
2.4	Análise termográfica.....	31
2.5	Eutanásia.....	32
2.6	Análise estatística.....	32
3	RESULTADOS.....	33
4	DISCUSSÃO.....	39
5	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

MANUSCRITO I

ESTUDO COMPARATIVO DA EFICÁCIA DA OZONIOTERAPIA E DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

*COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF OZONIOTHERAPY AND
LASER PHOTOBIMODULATION IN THE HEALING PROCESS IN
EXPERIMENTAL MODELS: A SYSTEMATIC REVIEW*

Paulo Badaró de Souza¹, Antônio Márcio Teixeira Marchionni², Alena Ribeiro Alves
Peixoto Medrado³

¹ Mestrando em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil.

² Professor adjunto do curso de Odontologia da Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil.

³ Professora adjunta do curso de Odontologia da Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil.

RESUMO

A fotobiomodulação laser e a ozonioterapia apresentam-se como possibilidades terapêuticas para o controle antimicrobiano e a biomodulação do reparo tecidual. O objetivo desta revisão sistemática foi comparar o efeito da fotobiomodulação laser com o do gás ozônio no reparo de lesões provocadas intencionalmente sobre tecidos de ratos. A pesquisa pelos estudos foi realizada mediante a busca eletrônica de artigos indexados nas bases de dados, PubMed, BVSsalud, Cochrane, Scielo e Google Acadêmico, a partir dos descritores: “cicatrização”, “ozônio”, “laser”, “terapia com laser de baixa potência”, “fotobiomodulação laser”; e seus correspondentes na língua inglesa: “wound *healing*”, “*ozone*”, “*low level laser therapy (LLLT)*”, “*laser photobiomodulation*”; conjugados através da expressão booleana AND. A amostra incluiu estudos publicados no período de 2013 a 2020. Cinco estudos foram selecionados para a presente revisão de acordo com os critérios de inclusão e exclusão delineados para a pesquisa. Todos os estudos realizaram análise histológica das seções teciduais tratadas. O uso das terapias biomoduladoras evidenciou diferenças significativas em favor do reparo de diferentes tecidos quando comparadas aos achados dos grupos controle. A longo prazo, o laser demonstrou ter uma ação mais eficiente em relação ao processo de contração de feridas. A maioria dos estudos destacou a falta de uniformidade no protocolo das terapias como a maior dificuldade encontrada, embora tenham sido unânimes em afirmar que a fotobiomodulação laser e a ozonioterapia tenham contribuído para a melhora do padrão cicatricial.

Palavras chave: Cicatrização. Ozônio. Laser. Terapia com Laser de Baixa Potência.

ABSTRACT

Laser photobiomodulation and ozone therapy are therapeutic possibilities for antimicrobial control and biomodulation of tissue repair. This systematic review aimed to compare the effect of laser photobiomodulation with that of ozone gas in the repair of injuries intentionally caused by mouse tissues. The search for the studies was performed through the electronic search of articles indexed in the databases, PubMed, BVSsalud, Cochrane, Scielo and Google Scholar, based on the descriptors: "healing", "ozone", "laser", "laser therapy low power", "laser photobiomodulation"; and its correspondents in English: "wound healing", "ozone", "low-level laser therapy (LLLT)", "laser photobiomodulation"; conjugated using the Boolean expression AND. The sample included studies published from 2013 to 2020. Five studies were selected for the present review according to the inclusion and exclusion criteria outlined for the research. All studies performed histological analysis of the treated tissue sections. The use of modulatory therapies showed significant differences in favor of the repair of different tissues when compared to the findings of the control groups. In the long run, the laser has been shown to have a more efficient action concerning the process of contracting wounds. Most studies highlighted the lack of uniformity in the therapy protocol as the greatest difficulty encountered, although they were unanimous in stating that laser photobiomodulation and ozone therapy contributed to the improvement of the healing pattern.

Keywords: Healing. Ozone. Lasers. LLLT.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o laser e a ozonioterapia apresentam-se como possibilidades terapêuticas nas diversas áreas de saúde, em especial, para controle antimicrobiano e biomodulação do reparo tecidual^{1,2}.

A fotobiomodulação laser, também denominada de terapia laser de baixa intensidade ou laserterapia, promove efeitos biológicos que podem ser classificados como de curto e longo prazo. O efeito imediato da fotobiomodulação inclui o aumento da produção de ATP mitocondrial, e a longo prazo, incremento dos processos de biossíntese celular. Na fase proliferativa da cicatrização esta modalidade terapêutica é capaz de estimular a neoangiogênese, sendo este evento biológico crucial para o suprimento de nutrientes teciduais e ativação de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que resulta na formação de novos capilares³. Acredita-se que o mecanismo de ação da laserterapia envolva a absorção de fótons com comprimentos de onda idênticos, pelos fotorreceptores, como a enzima citocromo C oxidase, de modo a interferir diretamente na síntese de ATP através da aceleração da cadeia de transporte de elétrons⁴. A fotobiomodulação laser impacta positivamente na modulação do reparo tecidual pois contribui para o aumento e a melhora do padrão organizacional das fibras colágenas. Ademais, essa terapia estimula a biossíntese de importantes fatores de crescimento e à proliferação de fibroblastos⁵.

O ozônio é um gás presente na atmosfera composto por três átomos de oxigênio que exerce uma forte ação oxidante. Contém uma estrutura molecular variável de alta energia sob temperatura normal e é decomposto de forma rápida e espontânea em O₂ e um átomo de oxigênio⁶. Durante este processo, chamado de ozonólise, há a formação de espécies reativas de oxigênio altamente instáveis. O efeito antimicrobiano do ozônio faz-se resultante da interação desses radicais com ácidos graxos insaturados e proteínas da membrana citoplasmática das células bacterianas, o que provoca a redução da atividade enzimática e interrompe a função respiratória desses microrganismos. Essa ação é inespecífica e seletiva para células microbianas, visto que não possuem sistema antioxidante⁷. A ozonioterapia detém uma ação terapêutica no reparo tecidual pela ativação dos mecanismos de síntese protéica, aumento da quantidade de ribossomos e mitocôndrias nas células. Essas

mudanças no nível celular explicam a elevação da atividade funcional e o potencial de regeneração de tecidos e órgãos modulado por esta terapia⁶.

Diante da falta de consenso sobre qual terapia é mais efetiva no reparo tecidual, o objetivo da presente revisão sistemática foi avaliar comparativamente a eficácia das terapias biomoduladoras, fotobiomodulação laser e ozonioterapia, no microambiente do reparo tecidual em estudos experimentais controlados.

2 METODOLOGIA

A presente revisão sistemática adotou as diretrizes do PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) para compilação e seleção de estudos, que respondessem à seguinte pergunta central: Qual terapia biomoduladora é mais eficaz na cicatrização de feridas, a fotobiomodulação laser ou a ozonioterapia? Para responder a esta pergunta realizou-se uma pesquisa nos bancos de dados: PUBMED, BVSALUD, COCHRANE, SCIELO e GOOGLE ACADÊMICO.

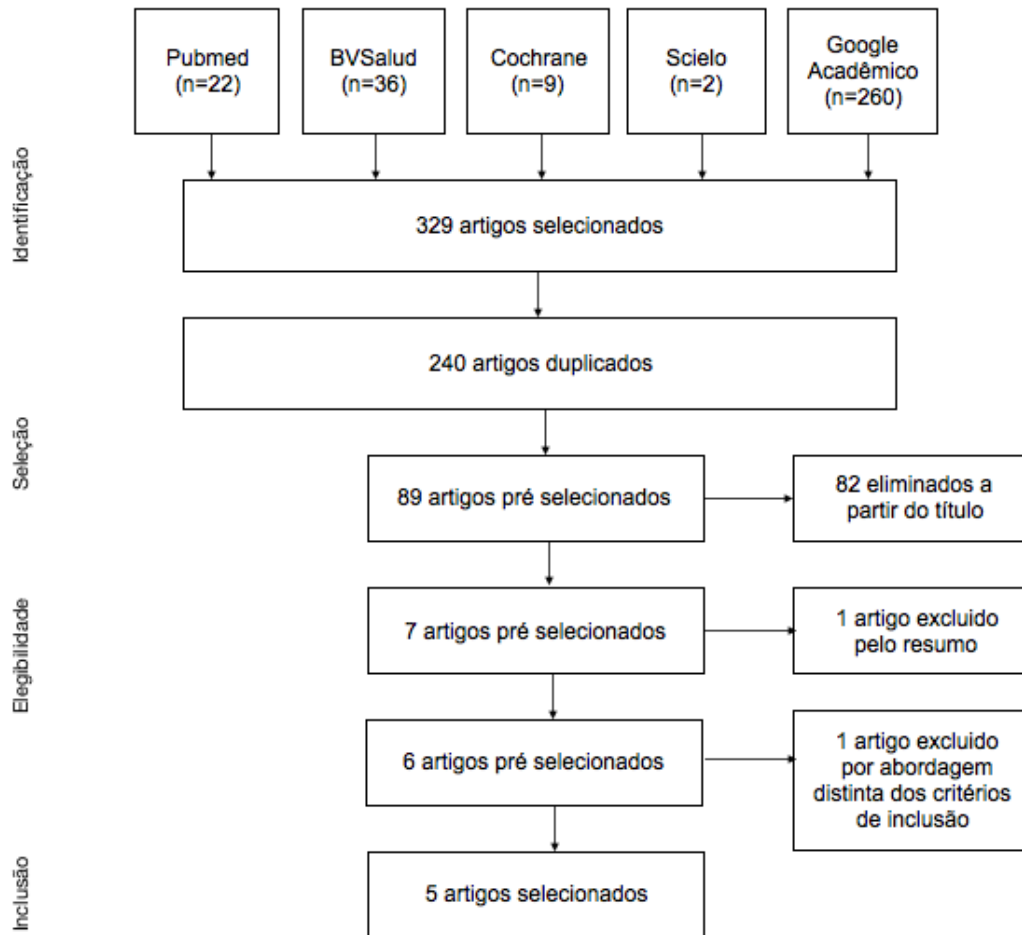
Como estratégia de busca utilizou-se os seguintes descritores da biblioteca virtual em saúde (DeCS): “cicatrização”, “ozônio”, “laser”, “terapia com laser de baixa potência”, “fotobiomodulação laser”; e seus correspondentes na língua inglesa: “wound healing”, “ozone”, “low level laser therapy (LLLT)”, “laser photobiomodulation”; conjugados através da expressão booleana AND.

A busca bibliográfica ocorreu nos meses de fevereiro e março de 2020. Foi utilizado o anagrama PICO, no qual a população incluiu estudos que avaliaram testes com animais e a intervenção contemplou a fotobiomodulação laser e o ozônio, usados no mesmo estudo. O controle foi representado pelos grupos experimentais que não receberam tratamento e para o desfecho foram considerados os efeitos dessas terapias no reparo tecidual.

Os critérios para seleção dos artigos incluíram estudos experimentais realizados em animais, publicados entre os anos 2013 a 2020 e que se constituíssem em testes comparativos feitos com fotobiomodulação laser e ozônio. Estudos que realizaram testes com humanos ou *in vitro*, e do tipo revisão de literatura, assim como relatos de caso clínico, não foram incluídos nesse estudo.

A estratégia de busca inicial resultou na seleção de 22 artigos retirados do Pubmed, 36 do BVSalud, 9 do Cochrane, 2 do Scielo e 260 do Google Acadêmico. Duzentos e quarenta manuscritos foram eliminados devido à duplicidade. Após a leitura dos títulos da amostra, 82 manuscritos foram descartados, resultando em 7 artigos selecionados. Após a leitura seletiva dos resumos, eliminou-se 1 artigo, e, posteriormente à leitura do artigo completo mais 1 estudo foi eliminado por não atender à temática proposta. Desta forma, apenas 5 artigos atenderam aos critérios de inclusão delineados para a presente revisão sistemática (Figura 01).

Figura 01 – Fluxograma da seleção de artigos através das diferentes etapas da revisão sistemática (PRISMA). Período de busca: fevereiro a março de 2020.



Fonte: Próprio autor

Os artigos foram avaliados quanto à sua qualidade metodológica pela escala de Jadad et al.⁸. Tal escala baseia-se em três critérios e pode atingir até cinco pontos: um ponto para a referência ao desenho de estudo como randomizado; um ponto se o método de randomização foi adequado ao estudo; um para a indicação de estudo duplamente cego; um ponto se o método de cegamento foi adequado e um ponto para a descrição das desistências ou perdas do estudo.

3 RESULTADOS

Dentre os cinco estudos catalogados, observou-se a inclusão de 2 espécies diferentes de ratos. Quatro estudos utilizaram ratos Wistar e 1, animais da linhagem Sprague-Dawley. Houve uma uniformidade no tocante ao sexo dos animais, pois em todos os estudos apenas ratos machos foram utilizados, os quais apresentavam peso variando entre 200 a 300 g aproximadamente. Em média, os grupos experimentais de cada estudo incluíram de 8 a 12 animais. Foram utilizados, nos cinco estudos, um total de 127 ratos. O estudo desenvolvido por Alan et al.⁹ utilizou 36 ratos alocados em 3 grupos com 12 ratos cada; Bayer et al.¹⁰ utilizaram 24 ratos alocados em 3 de grupos de 8 animais; Kazancioglu et al.¹¹ delinearam um estudo com 30 ratos designados em 3 grupos contendo 10 animais em cada; Yucesoy et al.¹² utilizaram 27 ratos, com 9 alocados em cada grupo e Yusufyuca et al.¹³, 30 ratos divididos em 3 grupos de 10 animais (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos artigos selecionados no período de fevereiro a março de 2020.

Autor	População	Intervenção: terapias	Controle	Resultados	Conclusão
Kazancioglu et al., (2013)	30 ratos Wistar; Grupo laser (n=10) Grupo ozônio (n=10) Grupo controle (n=10)	Foi criado um defeito ósseo de 5 mm de diâmetro na calvária dos ratos, preenchido posteriormente com enxerto sintético. O grupo LLLT (4J/cm ² , 808 nm, 120 segundos, 3 vezes por semana, 14 dias) foi comparado ao grupo ozônio que recebeu gás ozônio a 80% (120 segundos, 3 vezes por semana, 14 dias).	Não recebeu tratamento	Análises histomorfométricas evidenciaram que nos grupos LLLT e ozônio, houve maior neoformação óssea do que no grupo controle (p<0,05). No grupo LLLT, foram encontradas taxas mais altas de áreas ósseas novas quando comparadas ao grupo ozônio (p< 0,05).	A ozonioterapia e a laserterapia tiveram um efeito positivo na formação óssea no defeito calvarial em ratos, comparado ao grupo controle. No entanto, a terapia com ozônio foi mais eficaz que a LLLT.
Alan et al., (2015)	36 ratos machos Wistar Grupo laser (n=12) Grupo ozônio (n=12) Grupo controle (n=12)	Comparar os efeitos do laser infravermelho (810 nm, 0.3W, 12 J/cm ² , 3 vezes por semana, 28 dias) e do gás ozônio, realizado por aplicação tópica a 80% em feridas nos fêmures de ratos durante 30 segundos através de uma sonda, preenchidas com nano-hidroxiapatita.	Não recebeu tratamento	O grupo laser apresentou menor índice de formação óssea e maior número de células positivas à osteocalcina, presentes no tecido conjuntivo e na superfície óssea, após 4 semanas. No entanto, após 8 semanas, exibiu maior osteogênese e presença de osteocalcina na medula óssea. O grupo ozônio exibiu maior formação óssea (p>0.05) após 4 semanas e maior expressão de células positivas à osteocalcina após 8 semanas (p<0.05).	O grupo laser apresentou maior grau de formação óssea em relação ao controle. O grupo ozônio em comparação com o laser, neste estudo, não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 1 - Características dos artigos selecionados no período de fevereiro a março de 2020. (Continuação)

Autor	População	Intervenção: terapias	Controle	Resultados	Conclusão
Yucesoy et al., (2017)	27 ratos Wistar Grupo laser (n=9) Grupo ozônio (n=9) Grupo controle (n=9)	Foi realizada a dissecação e sutura do nervo mentual em 27 ratos. Um grupo recebeu fotobiomodulação laser (618 nm, 20 mW/cm ²) na parte proximal e na parte distal à sutura. A terapia foi realizada por 5 minutos diariamente por 21 dias. A quantidade de energia total foi 6 J/cm ² . Outro grupo recebeu tratamento com ozônio administrado uma vez a cada 3 dias por 21 dias, numa concentração de 75% por 60 segundos através de uma sonda via oral.	Não recebeu nenhum tratamento	O número de células de Schwann foi maior nos grupos que receberam terapia com ozônio e fotobiomodulação em comparação com o grupo controle. Obteve-se um maior número de células de Schwann no segmento proximal (p>0.05) comparado ao segmento distal da lesão (p< 0.05) nos grupos tratados, em relação ao controle.	Os autores consideraram o laser e o ozônio como métodos alternativos seguros para o tratamento da lesão nervosa.
Bayer et al., (2017)	24 ratos Sprague-Dawley. Grupo laser (n=8) Grupo ozônio (n=8) Grupo controle (n=8)	Comparar os efeitos da LLLT e ozonioterapia na mucosite induzida por 5-fluorouracil (intraperitoneal, 100mg/kg no primeiro dia e 65mg/kg no terceiro dia). Após a indução da ferida, o grupo laser (940 nm, 7 e 14 J/cm ²) recebeu a aplicação do laser por 20 segundos, durante 5 dias. O grupo ozônio recebeu tratamento com gás ozônio a 80%, na área ulcerada, por 120 segundos, durante 5 dias.	Não recebeu nenhum tratamento	O grupo tratado com LLLT obteve um aumento do PDGF-BB (p<0,0001). Embora o grupo ozônio tenha estimulado a expressão de bFGF, o grupo LLLT apresentou resultados mais significativos (p=0,0002).	Observou-se que os parâmetros de laser e ozônio foram bem definidos. A fotobiomodulação laser apresentou melhores resultados, mas os autores também indicam o uso do ozônio no tratamento de mucosite oral.

Tabela 1 - Características dos artigos selecionados no período de fevereiro a março de 2020. (Continuação)

Autor	População	Intervenção: terapias	Controle	Resultados	Conclusão
Yusufyuca et al, 2020.	30 ratos Wistar Grupo controle (n=10). Grupo laser (n=10). Grupo ozônio (n=10).	Comparação da laserterapia de baixa intensidade (850nm, 100 mW/cm ² , 4J/cm ² , em 21 dias consecutivos) e ozonioterapia, através de uma insuflação no peritônio de uma mistura gasosa de ozônio e oxigênio com uma dose de 2 ml (80 µm/ml) por 21 dias (uma vez a cada 2 dias), para o tratamento da lesão do nervo facial em ratos, avaliado por análise histomorfométrica.	Não recebeu nenhum tratamento	Após avaliação histomorfométrica, o grupo ozônio revelou resultados estatisticamente significativos após a lesão do nervo facial em comparação com o laser e os grupos controle em termos de ramificação das fibras nervosas (p=0,003), diâmetros das fibras nervosas (p = 0,0398), áreas de fibras nervosas (p=0,042) e números de axônios (p=0,0327). Embora o grupo LLLT tenha revelado um melhor padrão de cicatrização que o grupo controle, o resultado não foi estatisticamente significativo em termos de ramificação das fibras nervosas (p=0,6804), diâmetros das fibras nervosas (p=0,7424), áreas de fibras nervosas (p=0,7048) e números de axônio (p=0,7588).	A ozonioterapia apresentou diferenças estatisticamente significantes quando comparada aos grupos LLLT e controle, e proporcionou um tratamento seguro e eficaz para lesões do nervo facial em ratos.

Em relação à laserterapia, os dispositivos exibiram comprimento de onda que variaram entre 618nm a 940nm. A dosimetria também apresentou variação situando-se na faixa de 4 a 12J/cm². Dois estudos optaram pelo protocolo clínico de aplicação da fotobiomodulação laser em dias alternados^{9,11} e três, em dias consecutivos^{10,12,13}.

Todos os grupos experimentais que foram tratados com ozonioterapia utilizaram o ozônio sob a forma de gás. No entanto o modo da aplicação divergiu entre os estudos. Em três investigações a administração do ozônio ocorreu via perilesional⁹⁻¹¹. Na pesquisa realizada por Yucesoy et al.¹² o gás ozônio foi administrado com o auxílio de uma sonda oral e Yusufyuca et al.¹³ utilizaram o gás por via intraperitoneal. A concentração do gás ozônio utilizada foi de 75% em apenas um estudo¹² e 80%, nos demais manuscritos^{9,10,11,13}.

Em relação ao nível de qualidade dos estudos, segundo a escala de Jadad, et al.⁸, os estudos obtiveram pontuações entre dois e cinco. Três experimentos não informaram se houve alguma perda da população do estudo e um não informou sobre a randomização (Quadro 1).

Quadro 1 - Qualidade metodológica dos estudos de acordo com a escala de JADAD et al., (1996).

Características dos estudos	Alan et al., 2015	Bayer et al., 2017	Kazancioglu et al., 2013	Yucesoy et al., 2017	Yusufyuca et al., 2020
Randomizado	1	1	1	1	1
A Randomização foi descrita e é adequada?	1	1	1	1	1
Duplo cego	1	0	1	0	0
O cegamento foi descrito e é adequado?	1	0	1	0	0
Descreve perdas	0	1	1	0	0
Pontuação	4	3	5	2	2

4 DISCUSSÃO

O presente artigo compilou estudos experimentais que avaliaram o impacto do ozônio e da laserterapia sobre o processo de reparo tecidual em diferentes modelos experimentais de cicatrização. As terapias biomoduladoras demonstraram potencial eficácia sobre os variados tipos de tecidos estudados em comparação com os grupos controle em todos os estudos. Estudos mais antigos comumente apresentavam maior diversidade de protocolos ao passo que os estudos mais atuais tem procurado adotar consenso no que diz respeito aos aspectos metodológicos. Tendo em vista a tendência atual de padronização de protocolos, os autores da presente revisão sistemática optaram pela seleção de estudos publicados nos últimos 8 anos.

Contudo, neste estudo, observou-se variação de alguns parâmetros das terapias utilizadas a exemplo do comprimento de onda dos lasers e a concentração do gás ozônio. Alan et al.⁹ utilizaram a fotobiomodulação laser com comprimento de onda na faixa do vermelho (810nm), fluência de 12 J/cm², três vezes por semana, por quatro semanas. Os autores confrontaram a fotobiomodulação laser com aplicação de gás ozônio a 80% por 30 segundos e observaram que em um prazo maior houve maior formação de tecido ósseo no grupo laser, mas com concentração maior de células reagentes à osteocalcina no grupo ozônio. Bayer et al.¹⁰ compararam o laser de 940 nm com diferentes fluências por 5 dias e tratamento com gás ozônio a 80%, 120 segundos por dia, por 5 dias, sobre mucosa oral de ratos com mucosite oral induzida e relataram melhores resultados com a fotobiomodulação. Todavia, os autores destacaram a perda de animais do grupo controle decorrente do quadro de desnutrição, resultante do modelo experimental de indução de mucosite. Mas ainda assim, as duas terapias apresentaram efeitos locais e sistêmicos positivos sobre a mucosa dos ratos.

Kazancioglu et al.¹¹ fizeram uso da terapia laser com um comprimento de onda de 808 nm, com fluência de 4 J/cm² a cada 3 dias por 15 dias e em outro grupo, aplicaram ozônio a 80 % por 120 segundos com a mesma periodicidade. Os autores obtiveram resultados semelhantes para ambos os grupos no tocante à formação de tecido ósseo. Já Yucesoy et al.¹² testaram o laser vermelho (680nm) com 6 J/cm² de fluência, por 5 minutos diariamente durante 21 dias e gás ozônio, numa

concentração de 75% por 60 segundos, uma vez a cada 3 dias, por 21 dias. Em comparação ao grupo controle os grupos tratados demonstraram um padrão cicatricial do nervo lesado mais favorável em relação à cicatrização.

O Estudo de Yusuf¹³ utilizou a laserterapia com energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$ por 32 segundos em 21 dias consecutivos, esse dispositivo possui comprimento de onda de 850nm. No grupo ozônio, através da insuflação intraperitoneal, a mistura gasosa de oxigênio e oxônio, 97,5% e 2,5% a concentração respectivamente, foi insuflada a uma dose de 2ml (80 $\mu\text{m}/\text{ml}$) por 21 dias, sendo uma vez a cada 2 dias. Nessa perspectiva, esse estudo obteve melhor resultado no grupo ozonioterapia comparado ao grupo controle e LLLT, além disso, evidenciou-se que a ozonioterapia não deve ser realizada com uma mistura de gás ozônio e soro fisiológico.

Desta forma, pode-se observar que, nos estudos compilados, os resultados favoráveis foram descritos para ambas as modalidades terapêuticas, pois tanto a fotobiomodulação laser quanto a ozonioterapia demonstraram eficácia no processo de reparo tecidual. Todavia, em razão da diversidade de tipos de tecidos avaliados nos modelos experimentais, não foi possível realizar um tratamento estatístico dos resultados relatados, a despeito de um próximo padrão de similaridade de protocolos em todos os estudos.

Sabe-se que o ozônio reduz o estresse oxidativo da inflamação e aumenta o oxigênio parcial dos tecidos^{14,15}. Três artigos¹¹⁻¹³ demonstraram bons resultados do ozônio. Nesse sentido, foram evidenciadas as propriedades antibacterianas e estimuladoras do sistema imune, sobretudo na prevenção de infecção permitindo ao organismo desenvolver as etapas do reparo tecidual de forma fisiológica.

Nos estudos analisados, o método mais utilizado no tratamento de feridas foi a insuflação do gás ozônio, sendo perilesional⁹⁻¹¹, bucal¹² e intraperitoneal¹³. Contudo, o estudo de Chagas em 2015 demonstrou resultados favoráveis na cicatrização de feridas com a aplicação tópica do óleo ozonizado comparada ao grupo controle e documentou diferença significativa para hiperemia, infiltrado inflamatório, colágeno, erosão e inflamação da epiderme e derme. Além disso, os autores relataram a automutilação dos animais devido ao odor desagradável provocado pelo óleo ozonizado durante os 15 dias do seu estudo.¹⁶

A absorção da energia da fotobiomodulação laser sobre os tecidos é capaz de estimular a ação das mitocôndrias de modo a induzir maior produção de ATP além

de regular síntese de DNA e RNA com consequente proliferação celular⁹. Um estudo *in vitro* demonstrou haver maior estímulo da síntese de colágeno, liberação de fatores de crescimento e transformação de fibroblastos em miofibroblastos¹⁷. Os achados dos estudos dessa revisão sistemática corroboraram alguns desses efeitos nos tecidos avaliados submetidos à fotobiomodulação laser e ozonioterapia.

Bayer et al.¹⁰ destacaram que ainda existe falta de consenso sobre as dosagens das terapias. Alguns resultados conflitantes de diferentes protocolos demonstram a importância do avanço das pesquisas acerca desse tema. Ademais, nenhum dos artigos selecionados nesta revisão utilizaram o gerador de alta frequência associado ao laser, diferentemente do estudo de Sá em 2010, no qual demonstra uma melhora do padrão cicatricial após esta associação terapêutica em feridas cutâneas de ratos no período de 7 dias¹⁸. No entanto, segundo Souza et al. em 2015, percebe-se que a utilização apenas do gerador de alta frequência como terapia biomoduladora, com a finalidade de acelerar o reparo tecidual, exibiu resultados inferiores comparado ao laser de baixa frequência de 660nm, seja 8J/cm² ou 5J/cm², após 14 dias do estudo¹⁹.

A quantidade de estudos sobre laser e/ou ozônio é muito grande e as duas modalidades terapêuticas veem sendo utilizadas na área da saúde há muitos anos. Os critérios de inclusão e não inclusão desta revisão, na intenção de filtrar metodologias que podem servir de base para outros projetos, demonstrou a existência de um número pequeno de estudos já realizados com ratos que compararam estas terapias biomoduladoras.

A avaliação da qualidade metodológica dos estudos, selecionados pela Escala de Qualidade de Jadad⁸, evidenciou um bom escore de qualidade em três estudos. O rigor metodológico possibilita a extrapolação dos resultados de estudos experimentais para a prática clínica. Apesar do grande número de artigos encontrados com a seleção inicial por descritores na base de dado Google Acadêmico, muitos deles estavam repetidos e tangenciavam dos descritores estabelecidos. No entanto, nas demais bases de dados – Scielo, Pubmed, Cochrane e BVSalud – foi notório o pequeno número de artigos existentes.

5 CONCLUSÕES

Estudos experimentais incluídos nesta revisão sistemática que avaliaram comparativamente a fotobiomodulação laser e o gás ozônio revelaram efeitos favoráveis sobre reparo e contração de tecido cutâneo, osseointegração de enxerto sintético e reparo de tecido nervoso. Contudo, essas variáveis diversificadas analisadas em cada estudo dificultaram a realização de um tratamento estatístico dos dados. O laser e ozônio promoveram resultados melhores do que aqueles observados nos grupos que não foram tratados com estas terapias e, proporcionalmente, o gás ozônio se destacou mais. Ademais, verificou-se a existência de poucos trabalhos comparando a efetividade do laser de baixa frequência e a ozonioterapia acerca da cicatrização tecidual.

REFERÊNCIAS

1. Silva DCGG, da Costa MM, de Sá MCA, Plapler H, Silva SRG, Silva BSL. Low Level Laser therapy (AlGaInP) applied at 5 J/cm² reduces the proliferation of Staphylococcus aureus MRSA in infected wounds and intact skin of rats. *An Bras Dermatol.* 2013;88(1):50-5.
2. Bayer S, Kazancioglu HO, Acar AH, Demirtas N, Kandas NO. Comparison of laser and ozone treatments on oral mucositis in an experimental model. *Lasers Med Sci.* 2017;32(3):673-7.
3. Fortuna T, Gonzalez AC, Sá MF, Andrade Zda, Reis SRA, Medrado ARAP. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. *Int Wound J.* 2017;1–9. <https://doi.org/10.1111/iwj.1286>.
4. Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016 ; 22(3): . doi:10.1109/JSTQE.2016.2561201.
5. Isler SC, Uraz A, Guler B, Ozdemir Y, Cula S, Cetiner D. Effects of Laser Photobiomodulation and Ozone Therapy on Palatal Epithelial Wound Healing and Patient Morbidity. *Photomed and Laser Surg.* 2018; DOI:10.1089/pho.2018.4492.
6. Schulz S. The role of ozone/oxygen in clindamycin-associated enterocolitis in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Labo atory Animals* (1986) 20, 41-48.
7. Grootveld M, Holmes J, Silwood C, Claxson A, Prinz J, History of the Clinical Applications of Ozone. *Ozone: the revolution in dentistry.* London: Quintessence Publishing Co., 2004.
8. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Controlled Clinical Trials.* 1996;17(1):1-12.
9. Alan H, Vardi N, Ozgur C, Huseyin A, Yolcu U, Dogan DO. Comparison of the Effects of Low-Level Laser Therapy and Ozone Therapy on Bone Healing. *The J of Craniofacial Surg.* 2015;26(5):396-400.
10. Bayer S, Kazancioglu HO, Acar AH, Demirtas N, Kandas NO. Comparison of laser and ozone treatments on oral mucositis in an experimental model. *Lasers Med Sci.* 2017;32(3):673-7.
11. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of Laser and Ozone Therapies on Bone Healing in the Calvarial Defects. *The J of Craniofacial Surg.* 2013; 24(6): 2141-6.

12. Yucesoy T, Kutuk N, Canpolat DG, & Alkan A. Comparison of Ozone and Photo-Biomodulation Therapies on Mental Nerve Injury in Rats. *J of Oral and Maxillofac Surg.* 2017; 75(11):2323-32. doi:10.1016/j.joms.2017.04.016.
13. Yuca Y, Yucesoy T, Tok OE, Alkan A, The efficiency of ozone therapy and low-level laser therapy in rat facial nerve injury, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2020.01.017>.
14. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res.* 2006;37(4):425–35.
15. Yildirim AO, Eryılmaz M, Kaldırım U, Eyi YE, Tuncer SK, Eroğlu M, Durusu M, Topal T, Kurt B et al. Effectiveness of hyperbaric oxygen and ozone applications in tissue healing in generated soft tissue trauma model in rats: an experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2014;20(3):167–75.
16. Chagas LH, Mira A. Efeito do óleo ozonizado em lesões cutâneas em ratos. *Rev Cultivando o Saber.* 2015; edição especial: 168-181.
17. Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, Baxter GD. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. *J Athl Train.* 2004;39(3):223–9.
18. Leal CT, Bezerra AL, Lemos A. Effectiveness of HeNe 632.8 nm laser on skin tissue integrity repair in experimental animals: a systematic review. *Fisioter Pesqui.* 2012; 19(3):290-6.
19. Sá PH, Nunes HM, Santo LAE, Oliveira Júnior GC, Silva JMN, Carvalho KC, Alves WS. Estudo comparativo da ação do laser GaAlInP e do gerador de alta frequência no tratamento de feridas cutâneas em ratos: estudo experimental. *ConScientia Saúde,* 2010; 9(3): 360-366.
20. Sousa RC, Maia Filho ALM, Nicolau RA, Mendes LMS, Barros TL, Neves SMV. Action of AlGaInP laser and high frequency generator in cutaneous wound healing. A comparative study. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2015; 30 (12):2015-79.

MANUSCRITO II

**AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS SOB
EFEITO DE TERAPIAS BIOMODULADORAS**

*THERMOGRAPHIC ASSESSMENT OF CUTANEOUS WOUNDS IN RATS UNDER
THE EFFECT OF BIOMODULATIVE THERAPIES*

Paulo Badaró de Souza¹, Antônio Márcio Teixeira Marchionni², Alena Ribeiro Alves
Peixoto Medrado³

¹ Mestrando em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil.

² Professor adjunto do curso de Odontologia da Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil.

³ Professora adjunta do curso de Odontologia da Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Salvador, Bahia, Brasil.

RESUMO

O uso de terapias biomoduladoras no processo inflamatório que causam pouco ou nenhum efeito colateral ao paciente tem sido cada vez mais comuns. A fotobiomodulação laser interfere positivamente na cicatrização de ferimentos através do aumento da síntese de ATP e de colágeno. A ozonioterapia ativa os mecanismos de síntese protéica e aumenta a atividade dos ribossomos e mitocôndrias nas células. Durante as diversas fases do reparo tecidual acontecem alterações nos tecidos que modificam a temperatura local, que podem ser verificados através de termografia infravermelha. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da fotobiomodulação laser de 660nm, ozonioterapia e óleo ozonizado sobre a variação térmica do tecido através da termografia infravermelha, em feridas cutâneas de ratos. Foram utilizados 40 ratos distribuídos em 4 grupos de 10 ratos cada. Um grupo controle, grupo laser, grupo gás ozônio e grupo óleo ozônio. Cada grupo foi dividido em subgrupos de 5 ratos, os quais foram fotografados e sacrificados aos 5 e 10 dias respectivamente. Foi observado redução da temperatura média na área da ferida no grupo controle e com maior variação nos grupos submetidos às terapias no primeiro dia. Aos 5 dias os grupos tratados com as terapias biomoduladoras apresentaram médias de temperaturas menores que o grupo controle. Com destaque para o grupo gás ozônio que apresentou diferença de 1,8°C em relação ao controle. Aos 10 dias houve aproximação das médias termográficas da temperatura basal com exceção do grupo gás ozônio que manteve a média de temperatura elevada em 35,1°C. A utilização de termogramas pode ser útil para monitorar o padrão da microcirculação durante o reparo tecidual. E que as terapias biomoduladoras aqui estudadas causam alteração no tecido cutâneo submetido a uma agressão física, perceptível à luz da termografia.

Palavras chave: Cicatrização. Ozônio. Laser. Terapia com Laser de Baixa Potência. Termografia infravermelha.

ABSTRACT

Biomodulatory therapies in the inflammatory process that cause little or no side effects to the patient are increasingly common today. A biomodulation with low frequency laser shows positive changes in healing through an increase in the average of ATP and fibroblasts for example. Ozone therapy already activates prosthetic synthesis mechanisms and increases the amount of ribosomes and mitochondria in cells. During the various phases of tissue repair, changes in tissues that modify the local temperature can be verified using infrared thermography. The aim of this study was to evaluate the effects of 660nm laser photodynamics, ozone therapy and ozonized oil on a thermal variation of the tissue using infrared thermography, on skin wounds of rats. 40 rats were used, distributed in 4 groups of 10 rats each. A control group, laser group, ozone gas group and ozone oil group. Each group was divided into subgroups of 5 rats, which were photographed and sacrificed at 5 and 10 days respectively. A reduction in mean temperature was observed in the wound area in the control group and with greater variation in the groups used in therapies on the first day. At 5 days in which the groups have access to biomodulatory therapies that show media with a lower temperature than the control group. The highlight was the ozone gas group, which showed a difference of 1.8°C in relation to the control. At 10 days, there was an average of basal thermographic temperatures, with the exception of the ozone gas group, which maintained a high temperature average of 35.1°C. The use of thermograms can be useful to monitor the microcirculation pattern during technical repair. The biomodulatory therapies studied here cause changes in the skin tissue subjected to physical aggression, which is visible to light by thermography.

Keywords: Healing. Ozone and Laser. Low Power Laser Therapy. Infrared thermography.

1 INTRODUÇÃO

A inserção de terapias biomoduladoras na área de saúde que visam o reparo tecidual com pouco ou nenhum efeito colateral para o paciente têm despertado o interesse de muitas comunidades científicas. Métodos que utilizam a fotobiomodulação laser e o ozônio tem sido cada vez mais investigados com vistas à obtenção de protocolos clínicos padronizados. Tais terapias biomoduladoras induzem efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e biomoduladores teciduais que colaboram para a melhora do padrão cicatricial de diversos tipos de feridas¹.

A fotobiomodulação laser, com comprimento de onda que se situa no espectro de luz visível e invisível, interfere positivamente no processo cicatricial através do aumento da biossíntese de ATP, proliferação de linfócitos e aumento da atividade funcional e do número de fibroblastos^{2,3}. Esses efeitos são interdependentes e podem variar de acordo com o tipo do tecido tratado, da fluência e da irradiância da fotobiomodulação laser, assim como do tempo e dos intervalos de aplicação delineados para o paciente⁴.

O ozônio, componente da atmosfera na natureza, forma-se por meio da junção de três átomos de oxigênio e possui uma forte ação oxidante. Dispõe de uma estrutura molecular variável de alta energia sob temperatura normal, a qual é decomposta de forma rápida e espontânea em O₂ e um átomo de oxigênio⁵. Durante este processo, denominado ozonólise, há a formação de espécies de radicais de oxigênio altamente reativas. A ozonioterapia detém uma ação terapêutica pautada na ativação de mecanismos de síntese protéica e aumento da quantidade de ribossomos e mitocôndrias nas células⁶. Desta forma, essas mudanças no nível celular explicam a elevação da atividade funcional e do potencial regenerativo de tecidos e órgãos submetidos ao tratamento com ozônio^{7,8}.

Durante o processo cicatricial de feridas, a microcirculação no leito do ferimento passa por uma complexa mudança. Nos primeiros dias, há o predomínio da fase inflamatória aguda que resulta em modificações hemodinâmicas significativas com intensa exsudação e posterior proliferação vascular^{9,10}. Atualmente, tem sido utilizado um recurso de imagem que permite avaliar a variação do coeficiente térmico resultante do incremento do padrão circulatório em um dado tecido – a termografia infravermelha¹¹.

A termografia infravermelha capta a imagem através de uma câmera especial que mapeia o corpo do paciente e transforma a detecção da emissão infravermelha de cada sítio anatômico em temperatura¹². Foi introduzida como método de diagnóstico na Medicina desde 1960¹³. Todavia, com o avanço da tecnologia em coleta de dados, transferência e aferição de temperatura, evoluiu significativamente em termos de sensibilidade, especificidade e resolução de imagens¹⁴. Essa técnica não invasiva, sem contato e indolor, não fornece informações sobre as características morfológicas, mas das alterações funcionais, térmicas e vasculares do tecido¹¹. É um exame que possibilita a identificação da provável origem da dor, mediante uma análise da temperatura gerada pela microcirculação na região afetada. Pode ser aplicada no diagnóstico de doenças diversas como, dermatites, disfunções vasculares, lesões em nervos sensitivos, processos inflamatórios e no monitoramento do câncer de mama^{15,16}. Contudo, ainda não existem estudos que documentaram comparativamente a variação do coeficiente térmico em diferentes fases da cicatrização de feridas, em especial quando estas são submetidas à ação das terapias biomoduladoras já descritas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da fotobiomodulação laser de 660nm, da ozonioterapia e do óleo ozonizado no padrão de variação térmica do tecido cutâneo de ratos durante o reparo, através da termografia infravermelha.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA). Foi registrado com o número de protocolo 67/2019. O número do parecer de aprovação pelo CEUA foi CIAEP: 01.0039.2013.

2.2 Amostra

A amostra incluiu 40 ratos machos *Wistar* com peso médio de 250 gramas(g) provenientes do biotério da Faculdade Adventista da Bahia. Os animais foram alocados randomicamente em 4 grupos de 10 ratos cada, os quais foram sacrificados no 5^o e 10^o dias (20 animais em cada período) após o início dos testes. O Grupo 1 correspondeu ao Grupo Controle (GC) e não recebeu nenhum tipo de tratamento; O Grupo 2, denominado Grupo Laser (GL), foi submetido à fotobiomodulação laser com comprimento de onda de 660nm; O Grupo 3, denominado Grupo Gás Ozônio (GG), recebeu terapia com ozônio gasoso através de insuflação subepitelial e o Grupo 4, Óleo Ozonizado (GO), foi tratado com óleo de girassol 100% ozonizado gotejado sobre a superfície da lesão.

Durante o experimento os animais ficaram alojados na Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), em condições sanitárias de biotério convencional desta Instituição. Foram acondicionados em gaiolas individuais, etiquetadas, com chão coberto por maravalha e mantidos em condições padrão de temperatura (22-25°C), umidade relativa (50-52%), com ciclos de luz-escuro por 12 horas e expostos à luminosidade artificial doze horas por dia. A alimentação dos ratos foi feita com ração balanceada Nuvilah® (Suprilab) e água *ad libitum*.

2.3 Procedimentos cirúrgicos e utilização das terapias biomoduladoras

Os animais foram submetidos à pesagem, anestesiados com Cloridrato de quetamina 10% (Dopalen®, São Paulo, Brasil) 75 mg/ml e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan, São Paulo, Brasil) 5 mg/ml, com as dosagens de 2mg/kg e 3mg/kg

respectivamente. Em seguida, efetuou-se a tricotomia dorsal e antissepsia com iodopovidine (Rioquímica, São Paulo, Brasil).

Foi realizada uma incisão circular na região dorsal com o auxílio de um bisturi circular metálico, *punch*, (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha) com 6mm de diâmetro para a obtenção de uma ferida uniforme e padronizada, executada por um único operador devidamente calibrado.

As feridas dos ratos do Grupo Laser (GL) foram submetidas a 4 aplicações pontuais de 1 J/cm^2 , com dosimetria total de 4 J/cm^2 , por dia de aplicação. Utilizou-se um aparelho semiconductor de laser de arseneto de alumínio e gálio (AsAlGa, 9 mW, 670 nm, Laser de diodo de $0,031 \text{ W/cm}^2$), com emissão contínua e área da ponta ativa de $0,28 \text{ cm}^2$ (Laser VR-KC-610- Dentoflex, Brasil). A dosimetria final foi de 12 J/cm^2 pois os ratos foram irradiados em 3 dias consecutivos após o procedimento cirúrgico.

O ozônio foi produzido pelo gerador Philozon[®] (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil) na concentração de $13\mu\text{g/ml}$ de ozônio, a partir de oxigênio medicinal, com fluxo constante de 1L/min. A mistura com oxigênio foi capturada em uma seringa de 5ml e, através de uma agulha de insulina, o gás foi insuflado com volume de 1ml na borda da lesão, em cada aplicação. Este procedimento foi repetido por três dias consecutivos, após a cirurgia.

Foi administrado óleo de girassol ozonizado a 100% (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil). Aplicou-se apenas uma gota na superfície da lesão por 3 dias consecutivos nos mesmos moldes dos grupos anteriores.

Os animais foram submetidos às terapias biomoduladoras nos dias 1, 2 e 3 do estudo. Cada grupo com 10 animais teve metade dos animais sacrificados no 5º dia e a outra metade, no 10º dia.

2.4 Análise termográfica

Para avaliação do padrão circulatório local foi utilizada uma câmera infravermelha (FLIR T430sc, Victoria, Suécia) com 320×240 pixels de resolução e frequência de imagem de 60 Hz que captura imagens em tempo real e conectividade Wi-Fi (E60). O equipamento realiza estudos na faixa de temperatura de -15°C a 50°C e possui sensibilidade térmica (N.E.T.D.) maior que $0,05^\circ\text{C}$ e até 30°C . Atua na

faixa espectral de ondas eletromagnéticas compreendida entre 7,5 a 13 μ m, correspondendo a uma faixa de infravermelho distante.

Para obter um padrão das imagens adotou-se o seguinte protocolo: os ratos foram posicionados em decúbito ventral sobre um objeto fixo a 0,5m em relação ao solo e aclimatizados por um período mínimo de 10 minutos antes da coleta dos dados. A distância da câmera em relação aos animais foi de 0,5 m. O ambiente teve a sua temperatura controlada em torno de 20°C \pm 1°C.

No 1º dia, os ratos foram fotografados nos seguintes momentos: 10 minutos após a tricotomia; imediatamente após a cirurgia e imediatamente após a terapia (exceto o grupo controle). No 5º e 10º dias, os ratos de cada grupo foram novamente anestesiados e fotografados após 10 minutos de equalização térmica. Os critérios de normalidade e anormalidade adotados foram baseados nos estudos de Uematsu¹⁷,¹⁸, no qual se estabeleceu o padrão de anormalidade clínica de acordo com a variação de temperatura. Se o coeficiente de variação térmica for superior a 0,3, considera-se a alteração significativa.

2.5 Eutanásia

Após sedação profunda com a solução anestésica já descrita, os animais foram alocados em grupos na câmara de gás onde foi liberado gás carbônico em uma concentração de 5 litros por minuto.

2.6 Análise estatística

Foi criado um banco de dados no Microsoft® Excel® 2010 (versão 14.0.7132.5000), Microsoft® Office Professional Plus 2010, USA e analisado no software R (versão 3.1.1). A distribuição dos dados quanto à normalidade foi testada com o teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste ANOVA, seguido do teste post hoc Bonferroni. O nível de significância foi $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

A temperatura basal média dos ratos foi aferida com termômetro de mercúrio introduzida no reto e registrada em 33,2°C. A TABELA 2 ilustra os valores da temperatura dos animais em diferentes momentos do experimento. Observou-se que a temperatura basal média de todos os ratos foi de 33,2°C. Após a tricotomia, houve um aumento da temperatura basal média para 34,3° C nos 40 animais que pertenciam aos quatro grupos de estudo ($p < 0,05$), com Delta T (ΔT) de +1,1°C. Logo após o procedimento cirúrgico, houve uma diminuição da temperatura em todos os ratos, com média de 33,7°C e delta T de -0,6°C ($p > 0,05$).

Uma vez determinado que a temperatura média a ser adotada como base para a avaliação das terapias biomoduladoras, correspondeu àquela calculada após a cirurgia cutânea, os resultados de cada grupo experimental são descritos a seguir.

A. Grupo controle

Ao final do 5º dia, a temperatura média foi de 35,7°C, com incremento da temperatura da ordem de +2,0°C ($\Delta T = +2,0^\circ\text{C}$; $p < 0,05$). No 10º dia, a temperatura média foi de 33,3°C. A variação do coeficiente térmico foi negativa neste grupo com ΔT de -2,4°C ($p < 0,05$); (Figuras 5 e 9).

B. Grupo Gás Ozônio

Constatou-se que imediatamente após a utilização do gás ozônio a temperatura média dos animais tratados caiu para 33,1°C, com ΔT de -0,6°C ($p < 0,05$). Ao final do 5º dia, a temperatura média foi de 33,9°C, com incremento da temperatura da ordem de +0,8°C ($p > 0,05$). Por volta do 10º dia, no grupo tratado com gás ozônio, a temperatura média foi de 35,1°C. A variação do coeficiente térmico foi ascendente neste grupo, para este período ($\Delta T = +1,2^\circ\text{C}$; $p < 0,05$); (Figuras 6 e 10).

C. Grupo Óleo ozonizado

Foi verificado que logo após a utilização do óleo ozonizado a temperatura média local dos animais tratados caiu para 31,1°C, com delta T de -2,6°C ($p < 0,05$). Ao final do quinto dia, a temperatura média foi de 34,7°C, com

incremento da temperatura da ordem de $+3,6^{\circ}\text{C}$ ($p<0,05$). Por volta do décimo dia, no grupo tratado com óleo ozonizado, a temperatura média foi de $33,3^{\circ}\text{C}$. A variação do coeficiente térmico foi negativa ($\Delta T = -1,4^{\circ}\text{C}$; $p<0,05$); (Figuras 7 e 11).

D. Grupo Fotobiomodulação Laser

Neste grupo experimental, foi observado que a utilização da fotobiomodulação laser logo após o procedimento cirúrgico promoveu uma diminuição da temperatura média em relação ao pós-operatório da ordem de $32,7^{\circ}\text{C}$, com delta T de $-1,0^{\circ}\text{C}$ ($p<0,05$). No quinto dia após o início da terapia, a temperatura média no local da ferida ascendeu para 35°C , apresentando delta T de $+2,3^{\circ}\text{C}$. Dez dias após os procedimentos iniciais, a temperatura média foi de $33,7^{\circ}\text{C}$ ($\Delta T = -1,3^{\circ}\text{C}$; $p<0,05$); (Figuras 8 e 12).

Tabela 1 - Temperatura média com desvio padrão dos grupos experimentais em diferentes períodos do estudo.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TEMPERATURA MÉDIA EM $^{\circ}\text{C}$ E DESVIO PADRÃO			
	PÓS CIRURGIA	PÓS 1 ^a SESSÃO DE TERAPIA	5 DIAS	10 DIAS
GRUPO CONTROLE (GC)	$33,7^{\text{A}} \pm 0,8$	-	$35,7^{\text{B}} \pm 1,0$	$33,3^{\text{C}} \pm 1,1$
GRUPO GÁS OZÔNIO (GG)	$33,7^{\text{A}} \pm 0,8$	$33,1^{\text{D}} \pm 0,4$	$33,9^{\text{E}} \pm 0,7$	$35,1^{\text{F}} \pm 0,4$
GRUPO ÓLEO OZÔNIO (GO)	$33,7^{\text{A}} \pm 0,8$	$31,1^{\text{G}} \pm 0,7$	$34,7^{\text{H}} \pm 0,4$	$33,3^{\text{I}} \pm 2,2$
GRUPO LASER (GL)	$33,7^{\text{A}} \pm 0,8$	$32,7^{\text{J}} \pm 0,6$	$35^{\text{L}} \pm 0,7$	$33,7^{\text{M}} \pm 1,3$

ANOVA, diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre ^{A, C/ A, D/ A, E/ A, G/ A, H/ A, J/ A, L/ B, C/ B, E/ B, G/ B, H/ B, I/ B, L/ B, M/ C, D/ C, F/ C, G/ C, H/ C, I/ C, J/ C, L/ C, N/ D, G/ D, H/ D, I/ D, M/ E, G/ E, H/ E, I/ E, M/ F, G/ F, H/ F, L/ F, M/ G, H/ G, J/ G, L/ G, N/ H, I/ H, J/ H, L/ H, M/ H, N/ I, J/ I, L/ I, N/ J, M/ L, M/ L, N/ M, N}

A tabela 2 ilustra, comparativamente os coeficientes de variação térmica (ΔT) dos grupos experimentais nos diferentes períodos do estudo. Observou-se que no período imediato após a realização das 3 terapias biomoduladoras, todos os animais apresentaram delta T negativo em relação ao grupo controle (GG $\Delta T = -0,6^\circ\text{C}$; GO $\Delta T = -2,6^\circ\text{C}$ e GL $\Delta T = -1,0^\circ\text{C}$); ($p < 0,05$).

Cinco dias após o início das terapias, quando as temperaturas médias obtidas nos grupos experimentais foram comparadas às do grupo controle, foi constatado que a variação do coeficiente térmico foi significativamente negativa para todos os grupos tratados, sendo o maior ΔT observado entre o GC e o GG (GC/GG $\Delta T = -1,8^\circ\text{C}$; GC/GO $\Delta T = -1,0^\circ\text{C}$ e GC/GL $\Delta T = -0,7^\circ\text{C}$); ($p < 0,05$); (Tabela 2).

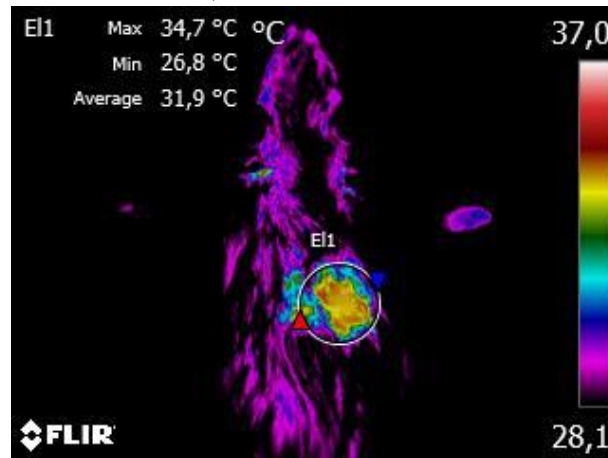
No 10º dia, verificou-se que as temperaturas médias dos grupos GO e GL foram próximas às do grupo controle e o delta T apresentou pequena variação (GC/GO $\Delta T = 0,0^\circ\text{C}$; GC/GL $\Delta T = -0,4^\circ\text{C}$); ($p > 0,05$). O grupo gás ozônio exibiu um aumento da temperatura média em relação àquela do grupo controle e delta T ascendente, com diferença estatisticamente significativa (GC/GG $\Delta T = +1,8^\circ\text{C}$); ($p < 0,05$); (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação entre grupos das médias de temperaturas durante as etapas do experimento

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TEMPERATURA MÉDIA EM °C											
	PÓS 1ª SESSÃO DE TERAPIA				5 DIAS				10 DIAS			
	GC	GG	GO	GL	GC	GG	GO	GL	GC	GG	GO	GL
GC	-	-0,6	-2,6*	-1,0*	-	-1,8*	-1,0*	-0,7*	-	+1,8*	0,0	+0,4
GG	-0,6	-	-2,0*	0,4	-1,8*	-	+0,8	+1,1*	+1,8*	-	-1,8*	-1,4*
GO	-2,6*	-2,0*	-	-1,6*	-1,0*	+0,8	-	+0,3	0,0	-1,8*	-	+0,4
GL	-1,0*	0,4	-1,6*	-	-0,7*	+1,1*	+0,3	-	+0,4	-1,4*	+0,4	-

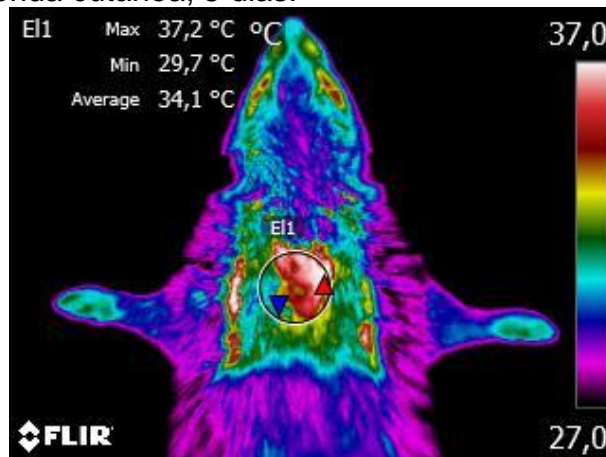
Comparação termográfica das médias encontradas em cada grupo GC/GG, GC/GO, GC/GL, GG/GO, GG/GL, GO/GG e GO/GL, nos momentos após a primeira sessão de terapia, após 5 dias e após 10 dias. *ANOVA, $p < 0,05$

Figura 1 - Termograma de animal do GC que exibe a temperatura máxima, média e mínima na área da ferida cutânea, 5 dias.



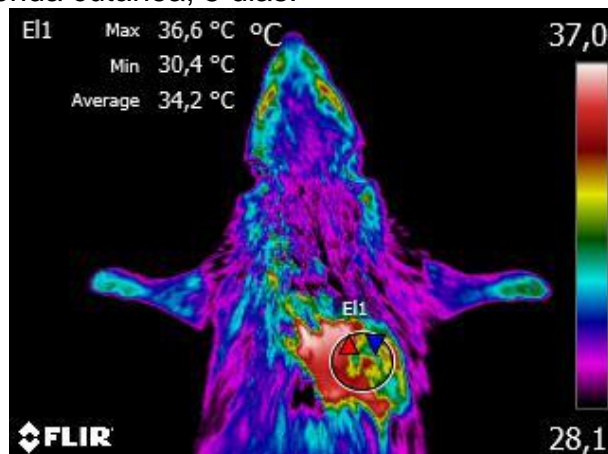
Fonte: Próprio autor

Figura 2 - Termograma de animal do GG que exibe a temperatura máxima, média e mínima na área da ferida cutânea, 5 dias.



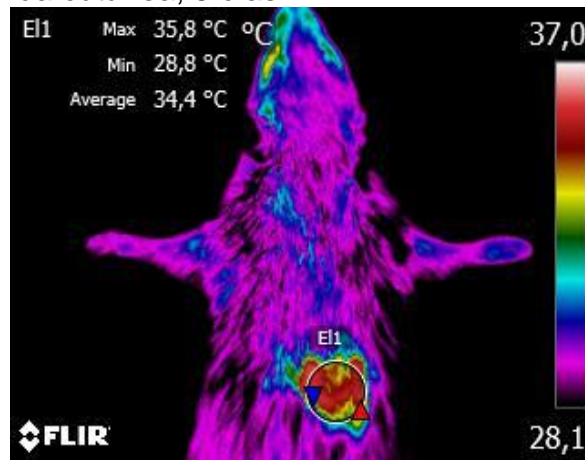
Fonte: Próprio autor

Figura 3 - Termograma de animal do GO que exibe a temperatura máxima, média e mínima na área da ferida cutânea, 5 dias.



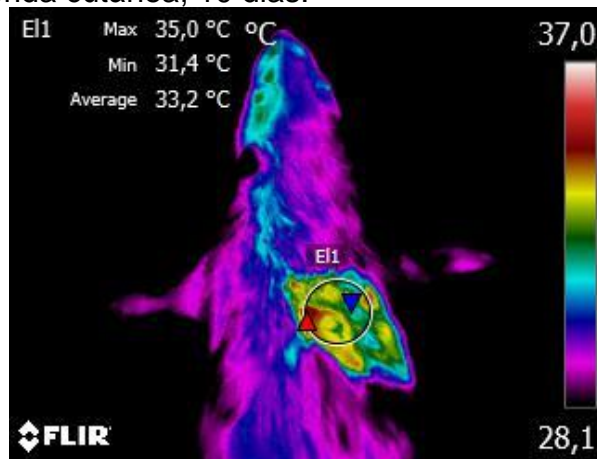
Fonte: Próprio autor

Figura 4 - Termograma de animal do GL que exibe a temperatura máxima, média e mínima na área da ferida cutânea, 5 dias.



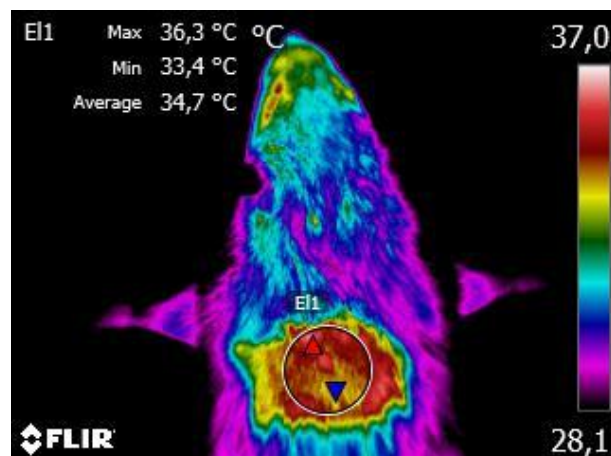
Fonte: Próprio autor

Figura 5 - Termograma de animal do GC que exibe a temperatura máxima, média e mínima na área da ferida cutânea, 10 dias.



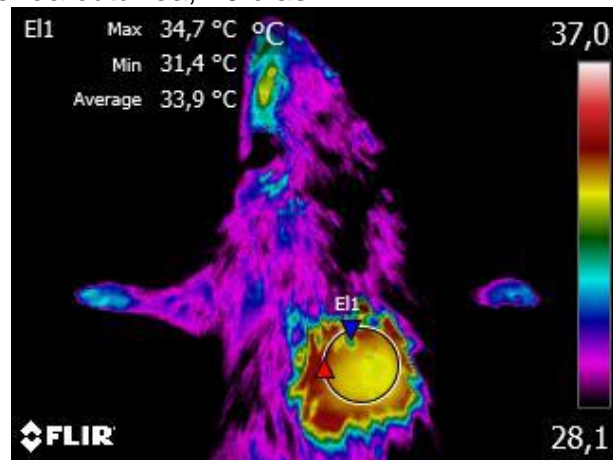
Fonte: Próprio autor

Figura 6 - Termograma de animal do GG que exibe a temperatura máxima, média e mínima na área da ferida cutânea, 10 dias.



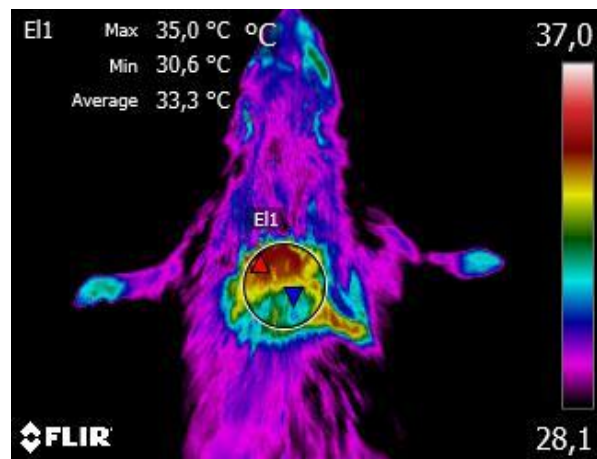
Fonte: Próprio autor

Figura 7 - Termograma de animal do GO que exibe a temperatura máxima, média e mínima na área da ferida cutânea, 10 dias.



Fonte: Próprio autor

Figura 8 - Termograma de animal do GL que exibe a temperatura máxima, média e mínima na área da ferida cutânea, 10 dias.



Fonte: Próprio autor

4 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a documentar o padrão de variação térmica à luz da termografia infravermelha na área correspondente aos ferimentos cutâneos induzidos experimentalmente em ratos, submetidos às terapias biomoduladoras com fotobiomodulação laser de 660nm, ozonioterapia e óleo ozonizado. Os efeitos induzidos por tais agentes terapêuticos em diferentes tipos de tecido têm sido descritos como potencialmente anti-inflamatórios, analgésicos e estimuladores do reparo tecidual¹⁹⁻²¹. Por outro lado, a utilização da TIV (termografia infravermelha) em modelos experimentais de cicatrização também tem sido explorada²². Contudo, o emprego da TIV para avaliação cronológica do gradiente térmico observado durante o reparo tecidual associado ao uso de terapias biomoduladoras ainda é escasso na literatura.

A utilização da TIV na Medicina foi descrita pela primeira vez em 1963, por Barnes, que demonstrou que os termogramas fornecem informações sobre possíveis disfunções, e, portanto, poderiam auxiliar no diagnóstico de estados patológicos¹³. Com uma câmera com detectores infravermelhos, o termograma registra os coeficientes térmicos na superfície do corpo determinados a partir da dissipação de calor. A variação térmica pode estar relacionada a fatores circulatórios e sofrer alterações devido às variações de fluxo e volume sanguíneo^{23,15}. As alterações vasculares registradas pelo termograma em uma região lesionada podem ajudar a identificar a provável origem da dor. A TIV é considerada uma técnica não invasiva, não radioativa e indolor, portanto, não possui restrições de uso apesar de suas limitações de aplicabilidade sobre características morfológicas^{16, 24}.

No presente estudo, foi constatado através da TIV um significativo aumento da temperatura local em todos os ratos logo após a realização da tricotomia, a qual representou uma injúria física que deflagrou a inflamação do tecido subcutâneo. Sabe-se que no microambiente da lesão ocorrem alterações na composição físico-química tecidual como, por exemplo, a baixa tensão de O₂, redução de pH, presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Essas reações deflagram a biossíntese de mediadores químicos que ativam as células envolvidas no processo de reparo tecidual, assim como a vasodilatação da rede capilar²⁵. Embora, a tricotomia tenha ocasionado um significativo aumento da temperatura em todos os

ratos incluídos no estudo, os termogramas só foram realizados após o tempo necessário para equalização térmica, que foi de 10 minutos. Como todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos de remoção de pelos e indução da ferida cirúrgica, acredita-se que os padrões de variação térmica encontrados neste estudo, possam de fato ser atribuídas às terapias biomoduladoras utilizadas.

Neste modelo experimental de cicatrização cutânea, assim como em outros modelos que avaliaram o reparo tecidual, os primeiros eventos que ocorrem no tecido lesado são vasoconstrição, na tentativa de conter o sangramento, e aumento da permeabilidade vascular, que contribui para a transmigração de leucócitos para o microambiente da ferida²⁶⁻²⁸. No primeiro dia de tratamento com as terapias biomoduladoras, houve uma diminuição das temperaturas médias nas áreas das feridas dos grupos tratados, com maior significância no GO (grupo óleo ozonizado). Além de um possível efeito anti-inflamatório, é importante destacar que essa aparente diferença no GO também pode ser justificada pelo fato de o óleo ozonizado ser mantido resfriado para garantir a manutenção da estabilidade do ozônio²¹. É provável que o tempo de equalização da temperatura para o uso do óleo tenha sido insuficiente para que este atingisse temperatura similar à do ambiente. O GG e o GL também apresentaram redução de temperatura da ordem de 0,6°C e 1,0°C, respectivamente. A ação anti-inflamatória imediata induzida por estas duas terapias biomoduladoras no tecido, tem sido descrita na literatura e pode justificar este resultado^{29, 30}.

No 5º dia do experimento, foi observado aumento de temperatura em todos os grupos, em especial no GC. Nesta etapa do reparo tecidual que corresponde à transição da fase exsudativa para a proliferativa no tecido conectivo, há aumento da migração celular, extravasamento de moléculas séricas, anticorpos e proteínas pelos capilares, viabilizados pelo aumento do aporte sanguíneo e da permeabilidade vascular²⁶. Tal fato é essencial para a formação de tecido de granulação, responsável pela nutrição das novas células da região em reparo¹⁰.

Embora estas alterações teciduais não tenham sido objeto de análise do presente estudo, pode-se perceber que, à luz da termografia infravermelha, o Delta T foi menor nos grupos submetidos às terapias biomoduladoras. Existem duas possíveis explicações para este achado termográfico. Uma delas está amparada na documentada ação anti-inflamatória da fotobiomodulação laser e do ozônio²⁸.

Marchionni et al.¹⁹, demonstraram que a irradiação com laser de baixa potência (660nm) no 5º dia da cicatrização, foi capaz de induzir um menor grau de inflamação exsudativa, com menor percentual de células polimorfonucleares. Os autores também verificaram que houve maior presença de miofibroblastos e biossíntese de colágeno. Os resultados histológicos deste estudo também evidenciaram uma cicatrização mais acelerada para o período de 5 dias. Embora, o presente estudo tenha se detido apenas à análise termoscópica e termográfica, é possível sugerir que nesta fase do reparo cutâneo correspondente ao 5º dia, os grupos tratados já tivessem acelerado o processo de cicatrização e os fenômenos proliferativos se instauraram no tecido. Desta forma, poder-se-ia hipotetizar que houve um equilíbrio entre a ação bioestimuladora tecidual e o potencial efeito anti-inflamatório das terapias biomoduladoras. Este aspecto ressalta a necessidade de realização de um estudo histopatológico da pele correspondente aos ferimentos cutâneos a fim de avaliar comparativamente a temperatura captada pelo termograma e as alterações teciduais, como o grau de inflamação e a proliferação fibroblástica e endotelial.

O estágio proliferativo é caracterizado por alta atividade celular nos procedimentos de fibroplasia, angiogênese e reepitelização. Neste sentido, a ação dos macrófagos infiltrados representa um fator determinante, pois estimula a angiogênese através da inibição de RIP1 quinase^{31,32}. Colombo et al.³³, compararam a formação de novos vasos sanguíneos de feridas cirúrgicas de ratos submetidos à fotobiomodulação laser 660nm com controles normais, e observaram aumento significativo do número de vasos no grupo laser, a partir do 4º dia de experimento. No 6º dia, os níveis de colágeno apresentados no grupo laser foram estatisticamente maiores do que os observados no grupo controle. Mais uma vez, é fato que tais autores realizaram uma minuciosa análise histopatológica das secções teciduais, porém os seus resultados nos permitem fazer ilações sobre o aumento da temperatura na área do ferimento dos animais submetidos às terapias biomoduladoras em nosso estudo. É possível que o incremento da vascularização à custa do brotamento de novos vasos sanguíneos nesta etapa do reparo, também possa justificar o aumento da temperatura nos grupos tratados, no 5º dia de avaliação.

Alguns estudos na literatura indicam similaridades terapêuticas entre o ozônio e a fotobiomodulação laser. O ozônio é conhecido por sua interação com os

componentes teciduais. Ele reage com os ácidos graxos poli-insaturados, cisteína, albumina, carboidratos, enzimas e até com o ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA)^{34,35}. Todos participam do processo de ozonização e doam elétrons por serem passíveis de oxidação. Estas reações formam as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os produtos de oxidação lipídica (POLs). Essas moléculas são responsáveis pelas ações bioquímicas do ozônio e funcionam como reguladores bioquímicos^{37,38}. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são radicais livres como os peróxidos de hidrogênio (H₂O₂), principais exemplos deste subproduto, que apesar de serem agentes oxidantes, são capazes de induzir a expressão de VEGF nos macrófagos e queratinócitos. Estimulam a angiogênese e a produção de colágeno. Isto mostra que a reparação tecidual está sujeita ao controle de oxidação e redução, conhecido por controle redox³⁶. Os produtos de oxidação lipídica (POLs) são moléculas mais estáveis, que se distribuem facilmente pelos tecidos, com a função de minimizar potenciais toxicidades. São produzidos após a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular e geram processos oxidativos agudos^{37,38}.

O sistema antioxidante enzimático corresponde à primeira linha de defesa do tecido vivo, e é composto pelas enzimas superóxido dismutase, glutadionaperoxidase, glutadionareductase, catalase e hemeoxigenase-I. O ozônio é capaz de ativar tais enzimas e dessa forma, estimular o aumento da migração de células tronco e células da medula óssea, da expressão de hemeoxigenase-I, envolvida na proliferação e apoptose celular e das metaloproteinases, envolvidas no equilíbrio entre síntese e reabsorção da matriz extracelular^{34,37-40}. Em nosso estudo, os animais do GG (grupo gás ozônio) foram os que apresentaram temperatura mais próxima da basal inicial, no 5º. dia pós-operatório. O grupo óleo ozonizado, por sua vez, também apresentou resultado menor que o controle e o laser, apesar de maior que o grupo gás. Com base nos estudos que demonstram a cronologia do processo de reparo nos ratos, neste período, a cicatrização transita entre a granulação e a produção de colágeno para compensar a perda tecidual. A modulação da resposta inflamatória reflete a capacidade de reduzir agentes pró-inflamatórios como o TNF- α , IL1- β e COX-2 na área da lesão, mediadores relacionados ao aumento da temperatura²². Este fato também poderia explicar as temperaturas mais baixas nos grupos submetidos às terapias biomoduladoras exibidas no 5º. dia.

Alguns trabalhos de pesquisa têm mostrado que o óleo ozonizado é eficiente em modular o processo inflamatório, estimular a angiogênese e promover reações enzimáticas que favorecem o metabolismo do oxigênio, de modo a melhorar a cicatrização da ferida cutânea^{41,21}. No presente estudo, observou-se que o óleo ozonizado foi capaz de alterar o padrão térmico na área da ferida, com indicativos de melhores resultados cicatriciais. Essas especificações quantitativas e qualitativas poderiam ser melhor observadas a partir do estudo morfológico das áreas lesionadas e tratadas do estudo

No estudo de kazancioglu⁴², verificou-se que a terapia com gás ozônio teve um efeito positivo na cicatrização óssea, atribuído às propriedades bactericidas e de estímulo aos agentes antioxidantes celulares. No mesmo trabalho foi observado que a terapia com ozônio obteve melhores resultados relacionados à formação óssea que a LLLT (880nm, 4J). Adicionalmente, Eroglu *et al*⁴³ verificaram que as feridas cirúrgicas orais de porcos tratados com gás ozônio tópico apresentou maior expressão de VEGF em comparação com o grupo controle que não recebeu tratamento. Tal fato indica que o ozônio pode contribuir para uma possível cicatrização precoce. Entretanto, um dos maiores desafios da ozonioterapia é comparar os resultados de diferentes estudos, pois existem muitas vias de administração do gás, ampla possibilidade de dosimetria e diferentes indicações para seu uso. De antemão, Himuro⁴⁴ descobriu que mesmo utilizando doses altas de ozônio dentro da janela terapêutica não houve inflamação letal causado pelo gás. Mas foi capaz de induzir vias de sinalização ao dano tecidual pré-existente.

No 10º dia do estudo, foi verificado que os grupos controle, óleo e laser, apresentaram temperaturas próximas da temperatura média inicial dos animais, temperatura basal. Esta informação indica que, neste período, as feridas destes grupos de animais já estavam em adiantado processo de cicatrização. O grupo gás ozonizado, entretanto, apresentou um valor maior de temperatura quando comparado aos demais grupos. Há relatos de que o ozônio produz efeitos biológicos sistêmicos e não apenas locais e que é capaz de interferir na atividade celular por um longo período de tempo, apesar de ter uma rápida reação inicial nos tecidos^{45,46}.

A presente pesquisa sugere fortemente que a utilização de termogramas pode ser útil para monitorar quali e quantitativamente, de forma não invasiva e indolor, o padrão da microcirculação—durante o reparo tecidual. Em especial, comprovou a

ação das terapias biomoduladoras aqui estudadas no tecido cutâneo submetido a uma agressão física, através da variação do coeficiente térmico. Contudo, cabe destacar que este estudo apresenta algumas limitações. A análise pontual de apenas dois períodos do reparo poderia ter sido ampliada. Ademais, idealmente, faz-se necessário analisar as alterações histopatológicas que se desenrolaram no tecido cutâneo dos animais a fim de verificar a ocorrência dos processos biológicos já citados, como a neoangiogênese, proliferação fibroblástica e a biossíntese de colágeno. E por fim, os autores sugerem também o desenvolvimento de estudos que avaliem o potencial bactericida das terapias biomoduladoras utilizadas a fim de correlacioná-lo com as alterações termoscópicas e termográficas que podem ser documentadas pela termografia infravermelha.

5 CONCLUSÃO

A termografia infravermelha mostrou-se uma eficaz ferramenta para captura de variações de temperatura durante todas as etapas da pesquisa. Foi possível perceber que as terapias biomoduladoras utilizadas causaram alterações vasculares sensíveis ao termograma. A análise das imagens permitiu concluir que houve uma variação térmica significativa nos grupos testados com as terapias, se comparados ao controle. Sobretudo, o gás ozônio se destacou dos outros grupos por apresentar médias de temperaturas menores durante a fase inflamatória do reparo e por elevar a média de temperatura no 10º dia, fase de remodelamento.

REFERÊNCIAS

1. Sousa APC, Valença Neto AAPA, Marchionni AMT, Ramos MA, Reis Júnior JA, Pereira MCMC, Cangussu MCT, Reis SRA, Pinheiro ALB. Effect of LED Phototherapy (670nm) on TGF- β Expression During Wound Healing: An Immunohistochemical Study in a Rodent Model. *Photomedicine and Laser Surgery* Volume 29, Number 9, 2011.
2. Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, Lalucci MPPS, Demarchi IG, Aristides SMA, Teixeira JJV, Silveira TGV, Lonardon MVC. Contribution of Photodynamic Therapy in Wound Healing: A Systematic Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Volume 21, March 2018, Pages 294-305.
3. Isler SC, Uraz A, Guler B, Ozdemir Y, Cula S, Cetiner D. Effects of Laser Photobiomodulation and Ozone Therapy on Palatal Epithelial Wound Healing and Patient Morbidity. *Photomed and Laser Surg*, v. 36, n. 11, p. 571-580, Nov. 2018.
4. Yucesoy T, et al. Comparison of Ozone and Photo-Biomodulation Therapies on Mental Nerve Injury in Rats. *J Oral and Maxillofac Surg*, . 2017 Nov; 75(11):2323-2332.
5. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. *Arch Med Res*, 2006 May;37(4):425–435.
6. Gupta AK, Brintnell WC. Sanitization of contaminated footwear from onychomycosis patients using ozone gas: a novel adjunct therapy for treating onychomycosis and tinea pedis? *J. cutan. med. surg.*, Hanover [online]. 2013; 17(4): 243-249.
7. Grootveld M, Aylin B. History of the Clinical Applications of Ozone .Ozone: the revolution in dentistry. London: Quintessence Publishing Co. 2004.
8. Alan H, Vardi N, Özgür C, Acar AH, Yolcu Ü, Doğan DO. Comparison of the Effects of Low-Level Laser Therapy and Ozone Therapy on Bone Healing. *J Craniofac Surg*, 2015 Jul; 26(5):396-400.
9. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Wound healing. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2007;20(1):51-8.
10. Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC Physiological wound healing. *Rev Med (São Paulo)*. 2010 jul.-dez.;89(3/4):125-31.
11. Fitzgerald A, Berentson-shaw J. Thermography as a screening and diagnostic tool: a systematic review. *N Z Med J*; 2012 Mar 9; 125(1351):80-91.
12. Robertson JK, Mastromonaco G, Burness G. Evidence that stress-induced changes in surface temperature serve a thermoregulatory function. *J Exp Biol*. 2020 Feb 26.

13. Font-Réaulx E, López RL, Díaz López LG. Infrared thermography mapping plus neuronavigation target location in an eloquent area cavernoma resection. *Surg Neurol Int.* 2020.
14. Filho A, Packer A, Costa A, Rodrigues-Bigaton D. Accuracy of infrared thermography of the masticatory muscles for the diagnosis of myogenous temporomandibular disorder. *JMPT* 2013.
15. Alfieri FM, dos Santos ACA, Battistella LR. The use of thermography as an assessment tool in physical medicine and rehabilitation – a review study. *Acta Fisiatr.* 2017;24(3):147-150.
16. Côrte ACR, Hernandez AJ. Application of medical infrared thermography to sports medicine termografia médica infrarroja aplicada a la medicina deportiva. *Rev Bras Med Esporte.* 2016 Jul/Ago; 22(4).
17. UEMATSU S. Thermographic imaging of cutaneous sensory segment in patients with peripheral nerve injury: skin-temperature stability between sides of the body. *Journal of neurosurgery,* 1985; 62(5):716-720.
18. Uematsu S, Edwin DH, Jankel WR, Kozikowski J, Trattner M. Quantification of thermal asymmetry: Part 1: Normal values and reproducibility. *Journal of neurosurgery,* 1988; 69(4):552-555.
19. Marchionni AMT, Medrado AP, Silva TMC, Fracassi LD, Pinheiro ALB, Reis SRA. Influence of Laser (1670 nm) and Dexamethasone on the Chronology of Cutaneous Repair. *Photomedicine and Laser Surgery* 2010; 28(5).
20. Taşdöven I, Emre AU, Gültekin FA, Öner MÖ, Bakkal BH, Türkcü ÜÖ, Gün BD, Taşdöven GE. Effects of Ozone Preconditioning on Recovery of Rat Colon Anastomosis After Preoperative Radiotherapy. *Adv Clin Exp Med.* 2019.
21. Anzolin AP, Silveira-Kaross NL, Bertol CD. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? 2020 *Medical Gas Research* | Published by Wolters Kluwer – Medknow.
22. Gomes CDFP, Dibai-Filho AV, Pallotta RC, Silva EAP, Marques ACF, Marcos RL, Carvalho PTC. Effects of low-level laser therapy on the modulation of tissue temperature and hyperalgesia following a partial Achilles tendo injury in rats. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy* 2017.
23. Filho ACCA, Teixeira MJ, Yeng LT, Kaziyama HHS. Termografia no diagnóstico das dores músculo-esqueléticas. Dor síndrome dolorosa mio-fascial e dor músculo-esquelética, 2008:187-190.
24. Bandeira F, Neves EB, Moura MAM, Nohama P. A termografia no apoio ao diagnóstico de lesão muscular no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte,* 2014;20(1):59-64.

25. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005 jan./mar; 41(1).
26. Oliveira IVP, Dias RVC. Cicatrização de Feridas: Fases e Fatores de Influência. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2012; 6(4):267-271.
27. Orsted RN, Keast D, Forest-Lalande L, Francoise M. Basic Principles of Wound Healing An understanding of the basic physiology of wound healing provides the clinician with the framework necessary to implement the basic principles of chronic wound care. *Wound Care Canada*, 2004 out; 9(2).
28. Medeiros AC, Dantas-Filho AM. Healing of surgical wounds. *J Surg Cl Res – Vol. 7 (2)* 2016 87-102.
29. Rocca JP, Zhao M, Fornaini C, Tan L, Zhao Z, Merigo E. Effect of Laser Irradiation on Aphthae Pain Management: A Four Different Wavelengths Comparison. *J Photochem Photobiol B*. 2018 Dec;189:1-4.
30. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. Author manuscript; available in PMC 2017 July 24.
31. Ueta T, Ishihara K, Notomi S, Lee JJ, Maidana DE, Efsthathiou NE, Murakami Y, Hasegawa E, Azuma K, Toyono T, Paschalis EI, Aihara M, Miller JW, Vavvas DG. RIP1 kinase mediates angiogenesis by modulating macrophages in experimental neovascularization. *PNAS*, 2019 November 19;116(47).
32. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg. Res.* 2012;49(1):35-43.
33. Colombo F, Valença Neto AAP, Sousa APC, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Reis SRA. Effect of Low-Level Laser Therapy (660 nm) on Angiogenesis in Wound Healing: A Immunohistochemical Study in a Rodent Model. *Brazilian Dental Journal* 2013; 24(4): 308-312.
34. Bayer S, et al. Comparison of laser and ozone treatments on oral mucositis in an experimental model. *Lasers Med Sci*, 2017 Apr; 32(3):673-677.
35. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol*. 2018 Mar;56:235-241.
36. Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 May;957:239-49.
37. Bocci V, Aldinucci C. Rational bases for using oxygen-ozone therapy as a biological response modifier in sickle cell anemia and beta-thalassemia: a therapeutic perspective. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004 Jan-Mar;18(1):38-44.

38. Bocci VA Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Arch Med Res. 2006 May;37(4):425-35.
39. Valacchi G, van der Vliet A, Schock BC, Okamoto T, Obermuller-Jevic U, Cross CE, Packer L Ozone exposure activates oxidative stress responses in murine skin. Toxicology. 2002 Sep 30;179(1-2):163-70.
40. Valacchi G, Pagnin E, Okamoto T, Corbacho AM, Olano E, Davis PA, van der Vliet A, Packer L, Cross CE Induction of stress proteins and MMP-9 by 0.8 ppm of ozone in murine skin. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jun 6;305(3):741-6.
41. Valacchi G, Zanardi I, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Sticozzi C, Bocci V, Travagli V. Ozonated Oils as Functional Dermatological Matrices: Effects on the Wound Healing Process Using SKH1 Mice. Int J Pharm. 2013 Dec 15;458(1):65-73.
42. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of Laser and Ozone Therapies on Bone Healing in the Calvarial Defects. The J of Craniofacial Surg, 2013 Nov; 24(6):2141-2146.
43. Eroglu ZT, Kurtis B, Altug HA, Sahin S, Tuter G, Baris E. Effect of topical ozonotherapy on gingival wound healing in pigs: histological and immunohistochemical analysis. J Appl Oral Sci. 2018 Dec 10.
44. Himuro H. The Effect of Ozone on Colonic Epithelial Cells. Kurume Medical Journal, 2017; 64: 75-81.
45. Torossian A, Ruehlmann S, Eberhart L, Middeke M, Wulf H, Bauhofer A. Pre-treatment with ozonized oxygen (O₃) aggravates inflammation in septic rats. Birkhäuser Verlag, Basel, 2004.
46. Foucaud L, Bennisroune A, Klestadt D, Laval-Gilly P, Falla J. Oxidative stress induction by short time exposure to ozone on THP-1 cells. Elsevier; 2005.