



FACULDADE
ILAPEO

Jânderson de Medeiros Cardoso

**Efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de feridas cutâneas
provocadas no dorso de ratos: avaliação clínica, histológica, histométrica e
imunoistoquímica**

CURITIBA
2024

Jânderson de Medeiros Cardoso

Efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de feridas cutâneas provocadas
no dorso de ratos: avaliação clínica, histológica, histométrica e
imunoistoquímica

Tese apresentada a Faculdade ILAPEO como parte
dos requisitos para obtenção de título de Doutor em
Odontologia, área de Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

CURITIBA
2024

Jânderson de Medeiros Cardoso

Efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de feridas cutâneas provocadas no dorso de ratos: avaliação clínica, histológica, histométrica e imunoistoquímica.

Presidente da Banca Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia (Orientador)

Prof. Dr. Rubens Moreno de Freitas

Profa. Dra. Flávia Fontão

Prof. Dr. Edilson Ervolino

Prof. Dr. Tarik Polo

Aprovada em: 08-05-2024

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente a Deus, que me deu possibilidade de caminhar até esse momento, podendo finalizar mais uma etapa da vida acadêmica.

Agradeço a minha esposa Joelma, meus filhos Jean e Jeane, por incentivarem eu permanecer nessa jornada, dando suporte nas horas onde eu não estava na clínica.

Ao meu orientador Professor Valdir, pela paciência pelas minhas falhas e dificuldades, onde sempre se mostrou disposto a orientar e ensinar com maestria.

Ao meu grande companheiro de pesquisa, agora já dr., Erton pela insistência em me fazer não desistir no meio do caminho, um verdadeiro irmão que ganhei nessa vida.

Aos colegas de doutorado sempre dispostos a se ajudarem mutuamente.

Aos professores da instituição ILAPEO, sempre buscando ajudar nas necessidades dos seus alunos, e aos professores da UNESP Araçatuba onde fizemos a pesquisa.

A todos funcionários da instituição ILAPEO, com destaque a nossa bibliotecária Andreia, que nos socorria nas pesquisa e buscas de artigos.

Sumário

1.	Artigo científico 1.....	06
2.	Artigo científico 2:.....	56

1. Artigo científico 1

Artigo de acordo com as normas da Faculdade ILAPEO, para futura publicação no periódico **Wound Repair and Regeneration**

Efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de feridas cutâneas provocadas no dorso de ratos: avaliação clínica, histológica, histométrica e imunoistoquímica

Jânderson de Medeiros Cardoso¹
Edilson Ervolino²
Erton Massamitsu Miyasawa¹
Leticia Helena Theodoro³
Luis Eduardo Marques Padovan⁴
Estevão Lopes Pereira⁵
Valdir Gouveia Garcia⁴

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade Ilapeo, área de Implantodontia, Curitiba, PR, Brasil.

² Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil.

³ Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil.

⁴ Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade Ilapeo, área de Implantodontia, Curitiba, PR, Brasil.

⁵ Graduando do Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil.

RESUMO

Tem crescido o interesse do tratamento com ozônio (O₃) não só na área médica como na odontológica porém os resultados são inconclusivos. O presente estudo analisou os efeitos do O₃ e a influência de diferentes doses na reparação de feridas cutâneas (± 10 mm de diâmetro) provocadas no dorso de 72 ratos (Wistar). Os animais foram aleatoriamente separados em quatro grupos que receberam os seguintes tratamentos: Grupo C animais não foram tratados com a mistura O₃/O₂; Grupo Oz15: receberam a mistura O₃/O₂ na dosagem de 0,3 mg/kg; Grupo OZ35: receberam a mistura O₃/O₂ na dosagem de 0,7 mg/kg; Grupo OZ50: receberam a mistura O₃/O₂ na dosagem de 1,0 mg/kg. Seis animais de cada grupo sofreram eutanásia aos 7,14 e 21 dias. Avaliação clínica, histológica, histométrica e imunoistoquímica (VEGF e TGF β 1) foram realizadas. Os resultados clínicos e histométricos revelaram OZ35 e OZ50 demonstraram cicatrização mais favorável e maior contração das feridas no grupo OZ50 (14 e 21 dias). Histologicamente evidenciaram que o grupo OZ50 apresentou aspectos histológicos condizentes com um processo de reparação tecidual mais acelerado enquanto a análise imunoistoquímica revelou maior imunomarcagem do VEGF nos grupos OZ35 (7 dias) e OZ50 (7 e 14 dias) comparado ao grupo C, no mesmos períodos; que o TGF β 1 revelou maior imunomarcagem nos grupos OZ35 (14 dias) e OZ50 (7 e

14 dias) comparado ao grupo C no mesmos períodos, o grupo OZ50 (14 dias) demonstrou maior imunomarcção comparado ao grupo OZ15, no mesmo período. Os resultados permitiram concluir que o uso sistêmico do O₃ favoreceu o reparo tecidual em feridas cutâneas; que a dose interfere na resposta biológica do tecido; que as concentrações de 0,7 mg e 1,0 mg de O₃ proporcionaram resultados benéficos, sendo melhor a dose de 1,0 mg de O₃ (50 µg/ml de O₃).

Palavras-chave: Ozônio; Cicatrização de feridas; Experimentação Animal; Ratos.

ABSTRACT

Interest in treatment with ozone (O₃) has grown not only in the medical field but also in dentistry, but the results are inconclusive. The present study analyzed the effects of O₃ and the influence of different doses on the repair of skin wounds (± 10 mm in diameter) caused on the back of 72 rats (Wistar). The animals were randomly separated into four groups that received the following treatments: Group C animals were not treated with the O₃/O₂ mixture; Group OZ15: received the O₃/O₂ mixture at a dose of 0.3 mg/kg; OZ35 Group: received the O₃/O₂ mixture at a dose of 0.7 mg/kg; OZ50 group: received the O₃/O₂ mixture at a dose of 1.0 mg/kg. Six animals from each group were euthanized at 7, 14 and 21 days. Clinical, histological, histometric and immunohistochemical (VEGF and TGF β 1) evaluations were performed. Clinical and histometric results revealed OZ35 and OZ50 demonstrated more favorable healing and greater wound contraction in the OZ50 group (14 and 21 days). Histologically showed that the OZ50 group presented histological aspects consistent with a more accelerated tissue repair process, while the immunohistochemical analysis revealed greater VEGF immunostaining in the OZ35 (7 days) and OZ50 (7 and 14 days) groups compared to the C group, in the same periods; that TGF β 1 revealed greater immunostaining in the OZ35 (14 days) and OZ50 (7 and 14 days) groups compared to the C group in the same periods, the OZ50 group (14 days) showed greater immunostaining compared to the OZ15 group, in the same period. The results allowed us to conclude that the systemic use of O₃ favored tissue repair in cutaneous wounds; that the dose interferes with the biological response of the tissue; that concentrations of 0.7 mg and 1.0 mg of O₃ provided beneficial results, with a dose of 1.0 mg of O₃ (50 µg/ml of O₃) being better.

KeyWords: Ozone; Wound Healing; Animal Experimentation; Rats.

INTRODUÇÃO

A reparação de feridas é um processo complexo e multifacetado que envolve diferentes fases sobrepostas destacando-se a hemostasia seguida das fases inflamatória, proliferativa e de remodelação (Lindley et al., 2016).

Logo após a lesão, inicia-se o processo de hemostasia que resulta na formação de uma rede de fibrina que atua como um arcabouço onde células do sangue, plasma e plaquetas ficam retidos, caracterizando a formação do coágulo sanguíneo. Esta serve também como fonte de

fatores de crescimento e quimiocinas que recrutam células incluindo as inflamatórias para migrarem para o leito da ferida (Martin 1997, Singer & Clark 1999, Uccioli et al., 2015). Neste momento moléculas de adesão atuam nas células endoteliais que permitem o recrutamento e extravasamento de neutrófilos e de macrófagos que liberam na área, fatores de crescimento e citocinas, incluindo interleucinas (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF α), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF2), fator de crescimento transformador- β , (TGF β) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que são de vital importância para controlar as etapas do processo de cicatrização (Werner e al., 2003, Colwell et al., 2005, Eming et al., 2014). Logo terá início a fase proliferativa que se caracteriza pela presença de vasos sanguíneos e células formadoras como os fibroblastos que se proliferam e iniciam a deposição de matriz colágena sobre a qual ocorre a migração dos queratinócitos a partir das margens da ferida seguindo a interface coágulo e derme subjacente. Este processo se completa com o fechamento epitelial de toda ferida e é denominado de reepitelização.

Quando não ocorrer adequadamente todos estes mecanismos normais do reparo poderá haver o comprometimento da cicatrização, desenvolvendo feridas crônicas. Três importantes condições etiológicas são determinantes para que isto ocorra: insuficiência vascular da área, influência de desordem sistêmica (por ex. diabetes mellitus) e efeitos de pressão local (Lindley et al., 2016). Feridas crônicas possuem características que se mostram independentes da sua etiologia, como a presença de inflamação, infecção, desregulação de proteases, redução da atividade do fator de crescimento, disfunção de células-tronco e senescência celular e dor (Yager et al., 1996, Eming et al., 2014, Stojadinovic et al., 2014). Esta condição constitui um constante preocupação e motivou a comunidade científica estudar meios, métodos e

tratamentos, aplicados localmente ou sistemicamente, que sejam capazes de contribuir para a tornar esta reparação um processo regular, uniforme e estável.

Uma busca recente de pesquisas sobre reparação tecidual em um dos maiores banco de dados (www.pubmed.com), tendo como descritor “*skin wound healing*” foi observado um universo de 22.579 citações nos últimos 10 anos (2013-2023), havendo entre estas 3.124 citações no último ano (2022-2023). Neste universo de dados observa-se várias pesquisas que empregaram diferentes métodos para promover a aceleração da reparação tecidual, como terapia fotônica, corrente elétrica, engenharia tecidual, enxerto de pele, fitoterápicos, células tronco, biomembranas e a ozonioterapia, entre outros.

O Ozônio foi descoberto em meados de 1840 pelo químico alemão Christian Friedrich Schönbein que é considerado o “Pai do Ozônio”. Em uma de suas pesquisas Schönbein notou “odor desagradável” ao passar corrente elétrica de alta intensidade pela água chamando-o de “ozone”. Esse gás teve inúmeras aplicações como desinfetar ambiente cirúrgico, tratar e purificar água, ozonizar azeite, sendo também muito utilizado como desinfetante em feridas purulentas durante a primeira grande guerra mundial. Mais recentemente seus benefícios foram aplicados em processamento de alimentos, na indústria e em diferentes áreas da medicina (Düzgün et al., 2022, Toy et al. 2023, Delgadillo-Valero et al., 2023, Romary et al., 2023).

O ozônio consiste de uma mistura de ozônio (5%) com o oxigênio (95%) que pode ser utilizado localmente (água ozonizada, óleo ozonizado, gás) ou por via sistêmica (insuflação retal, injeção intramuscular, subcutânea, intraperitoneal) para estimular a oxigenação dos tecidos, fortalecer o sistema de defesa do organismo e promover ação letal sobre microrganismos em áreas de infecção. Com sua capacidade de ativar sistemas enzimáticos protetores do organismo, o ozônio pode contribuir para aprimorar e potencializar a circulação sanguínea, aumentando a pressão arterial contribuindo para aprimorar a capacidade de distribuição e absorção de oxigênio nos eritrócitos o que gera resultados positivos na

microcirculação e oxigenação dos tecidos, potencializando a regeneração tecidual (Wang et al., 2018). A dose usual é de 1 e 100 mg de ozônio para cada litro de oxigênio, podendo variar de acordo com a via de administração, indicação terapêutica e temperatura ambiente, possuindo meia-vida em temperaturas baixas (140 minutos a 0°C) e de aproximadamente 40 min em temperaturas mais elevada (20°C) (Hernández & González, 2001)

Na odontologia o uso da ozonioterapia é ainda muito limitado. Nos últimos 10 anos quando pesquisado em banco de dados mundialmente reconhecido (www.pubmed.com) com os descritores "*ozone AND dentistry*" ou "*ozone therapy AND dentistry*" apresentou somente 354 e 205 citações, respectivamente. Algumas destas publicações são duplicatas e em sua maioria estão direcionadas a mecanismo de ação, efeitos na cárie dentária, clareamento dental, desinfecção de canal e cavidades, gengivite, estabilidade de implantes, controle do biofilme, mucosite, desordens da ATM, doenças dermatológicas, halitose, osteonecrose dos maxilares, tratamento da dor, entre outras (Khan et al., 2019)

Ao empregar o descritor "*skin wound healing AND ozone*" ou "*ozone therapy AND wound healing*" foram apresentados 40 e 112 citações nos últimos 10 anos (2013-2023) o que remete a necessidade de muito mais estudos empregando a ozonioterapia na reparação tecidual. Os dados relatados na literatura mostram-se inconclusivos face a heterogeneidade de resultados e de metodologias empregadas. Assim constitui propósito do presente estudo avaliar os efeitos da ozonioterapia sistêmica e a influência de diferentes doses da mistura O₃/O₂ no reparo de feridas abertas provocadas no dorso de animais. A hipótese primária do estudo é de que o O₃ promoverá efeitos benéficos na reparação tecidual e que a dose poderá interferir na resposta biológica. A hipótese nula é a de que não haverá benefícios adicionais do uso do O₃ na reparação de feridas cutâneas.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp (Processo n° 0287-2021) (Anexo 1). Foram utilizados setenta e dois ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) com idade entre 3 e 4 meses e peso médio de 335 gramas provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Unesp. Todos animais permaneceram, previamente ao início do experimento os em período de aclimação. Durante todo experimento foram mantidos em gaiolas plásticas com 4 animais cada ocupadas com cama de maravalha e permaneceram em ambiente climatizado com controle de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz de 12-12 horas. Durante todo período experimental os animais receberam ração sólida triturada (Ração Presence, Moinho Primor S.A., São Paulo, SP) e água “*ad libitum*”. Todos os procedimentos seguiram os princípios éticos de experimentação animal e seguiram o ARRIVE guideline para cuidados e uso de animais em laboratório (Kilkenny et al., 2010)

Cálculo da amostra

O cálculo amostral foi realizado utilizando o programa GPower® 3.1.9.2 considerando um valor de alfa (erro tipo I) e beta (erro tipo II) de 5% e 80% respectivamente, e um tamanho de efeito considerado médio ($ES=0.25$). Baseado no número de grupos e tempos operatórios foi determinado o uso total de 64 animais e considerando possíveis intercorrências e perdas de amostras, uma margem de 15% foi incluída que resultou um número total de 72 animais.

Procedimentos experimentais

Anestesia

Para o procedimento cirúrgico todos animais foram pesados previamente à anestesia. A seguir foram submetidos à anestesia geral obtida através de injeção intramuscular de uma associação de cloridrato de ketamina (80 mg/Kg de peso corporal do animal; Francotar, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de peso corporal do animal; Coopazine, Coopers Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil). Quando necessário será empregada dose anestésica complementar correspondente a 50% da dose primária.

Procedimento de criação da ferida cirúrgica

Após a realização da anestesia foi realizada a tricotomia da região dorsal dos animais e antissepsia da área com solução de iodo tópico a 10% (PVP-I Tópico 10%, Riodeine – Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil). Imediatamente após, foi realizado uma ferida única na porção média do dorso de cada animal utilizando-se de um “punch” circular com diâmetro interno de aproximadamente 10 mm, seguindo o plano sagital mediano dos animais. Para padronizar a ferida foi realizado duas marcações na superfície externa do “punch” representando 50% do seu diâmetro (Figura 1). A seguir foi realizado a dobradura da pele da região interessada do animal seguindo o plano sagital mediano que foi cuidadosamente apoiada na mesa cirúrgica. O “punch” foi posicionado com as marcas apoiadas na borda da pele e com o auxílio de um martelo cirúrgico foi executado uma batida suave e única, permitindo a liberação do fragmento de pele. Após sua soltura foi obtida uma ferida circular de borda regular, para todos os animais.

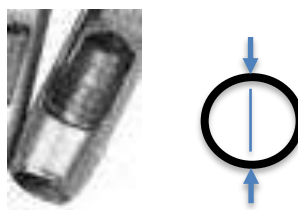


Figura 1. Ilustração do “punch” utilizado e marcas realizadas (setas).

Grupos e tratamentos

Os animais foram randomizados aleatoriamente em 4 grupos com 18 animais cada um que receberam os seguintes tratamentos: **C - Controle:** as feridas e os animais não receberam nenhum tratamento local ou sistêmico; **OZ15:** as feridas não receberam nenhum tratamento local porém os animais receberam via intraperitoneal uma dose de 0,3 mg de O₃/Kg de peso corpóreo do animal, com concentração de 15 µg/ml de O₃ liberada pelo gerador; **OZ35:** as feridas não receberam nenhum tratamento local porém os animais receberam via intraperitoneal uma dose de 0,7 mg de O₃/Kg de peso corpóreo do animal, com concentração de 35 µg/ml de O₃ liberada pelo gerador; **OZ50:** as feridas não receberam nenhum tratamento local porém os animais receberam via intraperitoneal, uma dose de 1,0 mg de O₃/Kg de peso corpóreo do animal, com concentração de 50 µg/ml de O₃ liberada pelo gerador.

Gerador do Ozônio

Foi utilizado no presente estudo um gerador de ozônio comercialmente denominado de Philozon Medplus V (Philozon, Balneário Camboriu, Santa Catarina, Brasil) que possui as seguintes características: (Registro na Anvisa sob no. 80472910001), válvula de segurança com sistema de Vácuo, regulagem automática do fluxo de oxigênio, catalizador interno automático e possibilidade de concentrações produzidas ajustáveis entre 5 e 60 µg/ml, podendo ser definidas no display no painel do equipamento.

Eutanásia dos animais e obtenção das amostras

Seis animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia realizada por dose excessiva (150 mg/kg de peso corporal) de anestésico (Tiopental[®], Cristalia, Produtos Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brazil) após 7, 14 e 21 dias dos procedimentos operatórios e

tratamentos. A seguir as peças de tecido mole da região dorsal envolvendo toda extensão da ferida cirúrgica foram removidas por intermédio do uso de bisturi de Bard-Parker com lâmina 15C e tesoura reta de ponta romba, tomando-se o cuidado de abranger uma margem de segurança de 1cm de pele ao redor de toda ferida e abrangendo toda extensão do tecido conjuntivo subcutâneo da área. As peças anatômicas obtidas foram identificadas, estiradas em cassetes plásticos e imersas em solução de formaldeído a 4% permanecendo por um período mínimo de 48 horas. Após este período foram direcionadas ao processamento laboratorial.

Processamento laboratorial

As peças anatômicas removidas seguiram o trâmite laboratorial de rotina (lavagem durante 24 horas em água corrente, desidratação em álcool etílico de modo crescente (70% até álcool absoluto), diafanizadas em banhos de xilol, banhos de parafina e incluídas em blocos de parafina. Cortes semi-seriados com 5 micrômetros de espessura foram realizados, sendo que parte destes cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H.E.) e os demais submetidos à técnica de imunistoquímica.

Obtenção dos resultados

Avaliação clínica das feridas

Todas feridas de todos os grupos foram avaliadas do ponto de vista clínico por um profissional treinado e com comprovada experiência clínica (JMC) onde as seguintes condições clínicas foram observadas: contração da ferida, presença de vasos sanguíneos visíveis na área da ferida, presença e características de crosta, edema, sangramento e presença de inflamação e infecção.

Avaliação histológica das feridas cirúrgicas

As lâminas histológicas de cada grupo e tempo foram avaliadas por um especialista na área (EE) e seguiu o seguinte protocolo. Inicialmente foi avaliado as características do

epitélio a partir da margem dos tecidos onde foi determinado a área ocupada por tecido epitelial (ATE) e a seguir, foi avaliado a superfície ocupada pelo tecido epitelial (STE). No tecido conjuntivo na área central da ferida foi avaliado a quantidade de células inflamatórias (CI) e a área ocupada por fibras colágenas (AFC) sendo os dados obtidos submetidos a avaliação estatística.

Avaliação histométrica das feridas

As feridas de todos animais e grupos foram fotografadas em todos períodos experimentais (0 h, 7, 14 e 21 dias). Para isso cada animal foi posicionado em decúbito ventral em mesa cirúrgica de tal modo que a ferida permanecesse o mais paralelamente possível ao solo. Utilizou-se de máquina fotográfica digital (Canon 60D, Japão) com a objetiva Macro 100 (Canon 60D, Japão) fixada em uma estativa com o objetivo de manter padrão a distância entre a superfície da ferida e a objetiva da máquina fotográfica. A seguir as imagens de cada animal-grupo foram submetidas em um software processador de imagens de domínio público, o Image J[®] (National Institutes of Health, USA), onde a medição da área de cada ferida obedeceu o seguinte procedimento: com a imagem na tela do computador, o cursor do mouse foi demarcou o contorno de toda extensão da ferida (perímetro) sendo a medida obtida expressa em milímetros (mm). Este procedimento foi realizada por dois profissionais experientes (EMM e JMC).

Calibração dos examinadores

A medição das feridas em cada um dos períodos (0 hora, 7, 14, 21 dias) foram realizadas separadamente e em períodos diferentes (7 dias) por dois profissionais (EMM e JMC). Os resultados obtidos pelos examinadores foram submetidos à teste estatístico para avaliar o coeficiente de correlação interclasse (CCI).

Avaliação Imunoistoquímica

Os cortes foram submetidos ao método da imunoperoxidase indireta para identificação das proteínas VEGF e TGF β -1. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão específico (Diva decloaker®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em dois lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-VEGF, anti-TGF β -1. A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Harris desidratados em etanol, diafanizados em xilol e, recobertos com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

2.5 Avaliação estatística

Para a análise estatística dos dados clínicos das feridas foi empregado o programa IBM (International Business Machines Corp., Armonk, Nova Iorque, USA). Para avaliação da normalidade dos dados e distribuição das amostras foi aplicado os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Posteriormente foi aplicado o teste ANOVA a um fator (Análise de

Variância), seguido de pós-teste de comparações múltiplas paramétricas de Games-Howel para variâncias heterogêneas, sendo adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Avaliação clínica

A avaliação das feridas seguiu um padrão de avaliação onde foram anotados todas evidências clínicas da reparação como a contração, vasos visíveis, presença e características da crosta, edema, sangramento, presença de inflamação e sinais de infecção (Figura 2). Clinicamente pôde ser observado imediatamente após a realização das feridas cutâneas que todas demonstraram bordas nítidas e tamanho regular, próximo ao diâmetro do "punch", o que demonstra a efetividade do método para sua criação, podendo ser observado no seu interior a presença de capilares sanguíneos em sua derme, não sendo observado sinais de maior sangramento, infecção ou inflamação (Figura 3).

Aos 7 dias de pós-operatório as feridas do grupo C demonstraram presença de crosta seca, com sinais de deslocamento parcial na margem da ferida em toda sua extensão, diferentemente das feridas dos demais grupos. As feridas dos grupos OZ15, OZ35 e OZ50 demonstraram crosta úmida e em alguns locais início de soltura da crosta em sua margem. Há similaridade de características clínicas das feridas destes grupos, neste período.

Aos 14 dias de pós-operatório todas as feridas de todos os grupos demonstraram deslocamento total da crosta no entanto as do grupo C neste período mostraram-se com menor grau de contração, comparadas às dos demais grupos. Na análise comparativa entre as feridas de todos grupos observa-se que as feridas dos grupos OZ35 e OZ50 foram as que demonstram estado mais adiantado de cicatrização, com maior contração e menor área de vermelhidão na sua porção central.

Aos 21 dias todas feridas demonstraram ausência total da crosta porém as feridas dos grupos C e OZ15 ainda exibiram área ligeiramente avermelhada na sua porção central em comparação com as dos grupos OZ35 e OZ50 que evidenciaram total fechamento da ferida com a presença de cicatriz. Destaca-se que nenhuma ferida demonstrou qualquer efeito indesejável como sangramento e infecção durante o transcorrer da pesquisa.

	Grupo Controle	Grupo OZ15	Grupo OZ35	Grupo OZ50
0 hora				
Contração de ferida	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Vasos visíveis	Presente	Presente	Presente	Presente
Presença de Crosta	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Crosta úmida	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Crosta Sêca	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Deslocamento da crosta	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Edema	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Sangramento	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Inflamação	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Infecção	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7 dias				
Contração de ferida	Presente	Presente	Presente	Presente
Vasos visíveis	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Crosta	Presente	Presente	Presente	Presente
Crosta úmida	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
Crosta Sêca	Presente	Presente	Ausente	Presente
Deslocamento da crosta	Presente	Presente	Ausente	Presente
Edema	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Sangramento	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Inflamação	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Infecção	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
14 dias				
Contração de ferida	Presente	Presente	Presente	Presente
Vasos visíveis	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Crosta	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Crosta úmida	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Crosta Sêca	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Deslocamento da crosta	Ausente	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Edema	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Sangramento	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Inflamação	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Infecção	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
21 dias				
Contração de ferida	Presente	Presente	Presente	Presente

Vasos visíveis	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Crosta	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Crosta úmida	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Crosta Sêca	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Deslocamento da crosta	não se aplica	não se aplica	não se aplica	não se aplica
Edema	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Sangramento	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Inflamação	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Presença de Infecção	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Figura 2. Avaliação clínica das feridas provocadas no dorso de ratos nos diferentes grupos e períodos pós-operatório.

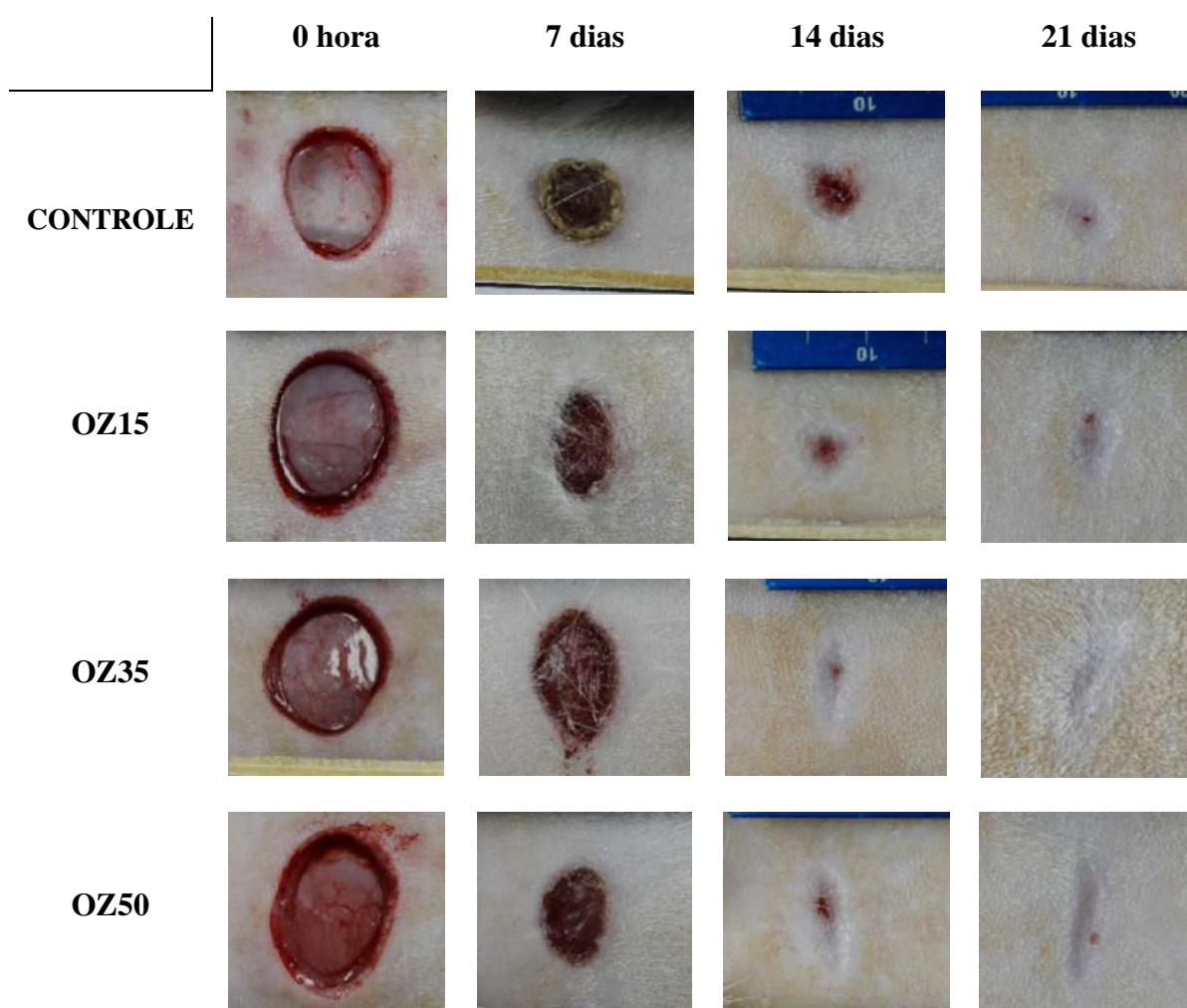


Figura 3. Características clínicas das feridas cutâneas provocadas no dorso de ratos nos diferentes grupos (C, OZ15, OZ35, OZ50) e períodos pós-operatórios (0 hora, 7, 14 e 21 dias).

Avaliação histológica

Aos 7 dias pós-operatórios as feridas cirúrgicas se mostraram com epitélio estratificado pavimentoso proliferando a partir de suas bordas em direção ao seu centro. Na superfície da ferida havia uma delgada crosta. O tecido conjuntivo subjacente ao epitélio/crosta se mostrava intensamente vascularizado, com grande quantidade de células inflamatórias e alguns fibroblastos, elementos estes sustentados por uma delicada rede de fibras colágenas (Figura 4).

Aos 14 dias pós-operatórios o tecido epitelial recobria grande parte da ferida. Remanescentes da crosta ainda estavam presentes em alguns espécimes. O tecido conjuntivo subjacente se mostrava intensamente vascularizado, com algumas células inflamatórias e repleto de fibroblastos, os quais se mostravam sustentados em uma matriz extracelular composta por moderada quantidade de fibras colágenas (Figura 5).

Aos 21 dias pós-operatórios o tecido epitelial recobria toda a ferida cirúrgica. O tecido conjuntivo subjacente ainda se mostrava bastante vascularizado, no entanto, com poucas células inflamatórias e muitos fibroblastos, os quais estavam associados a grande quantidade de fibras colágenas. Nesta etapa foi possível observar o início da reestruturação dos anexos de pele, tais como pêlos e glândulas (Figura 6).

Ao se estabelecer uma comparação entre os grupos dentro de seus respectivos períodos experimentais, foi constatado que as características histológicas se mostraram muito similares entre si, todavia, o grupo OZ50 apresentou alguns aspectos histológicos condizentes com um processo de reparação tecidual mais acelerado, tais como, espessura e padrão de celularidade da epiderme e quantidade de fibras colágenas na derme.

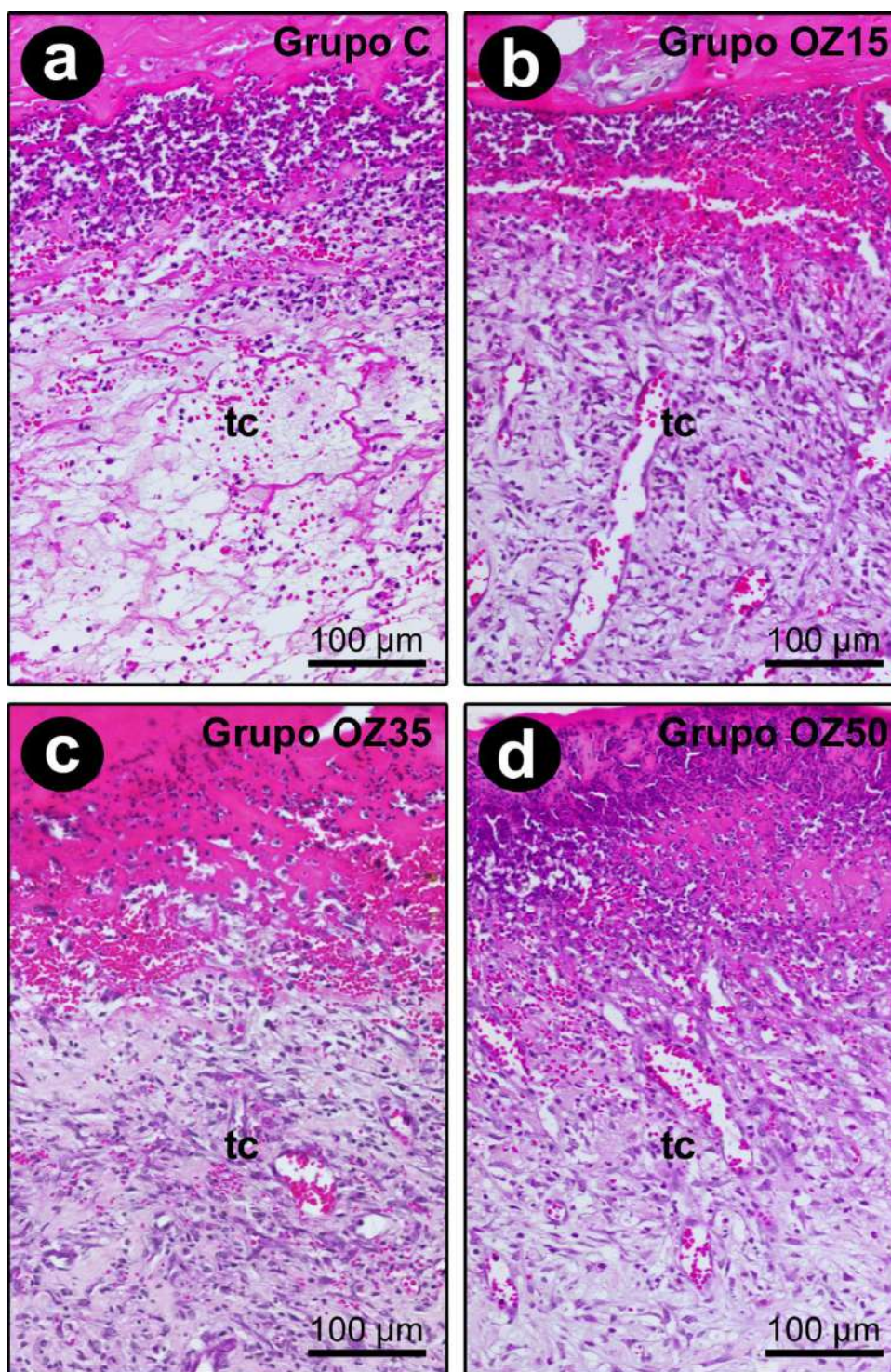


Figura 4. Aspecto histológico da pele aos 7 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando as características histológicas do tecido conjuntivo situado no centro da ferida cirúrgica grupos C (a), OZ15 (b), OZ35 (c) e OZ50 (d) aos 7 pós-operatórios. Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 μm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

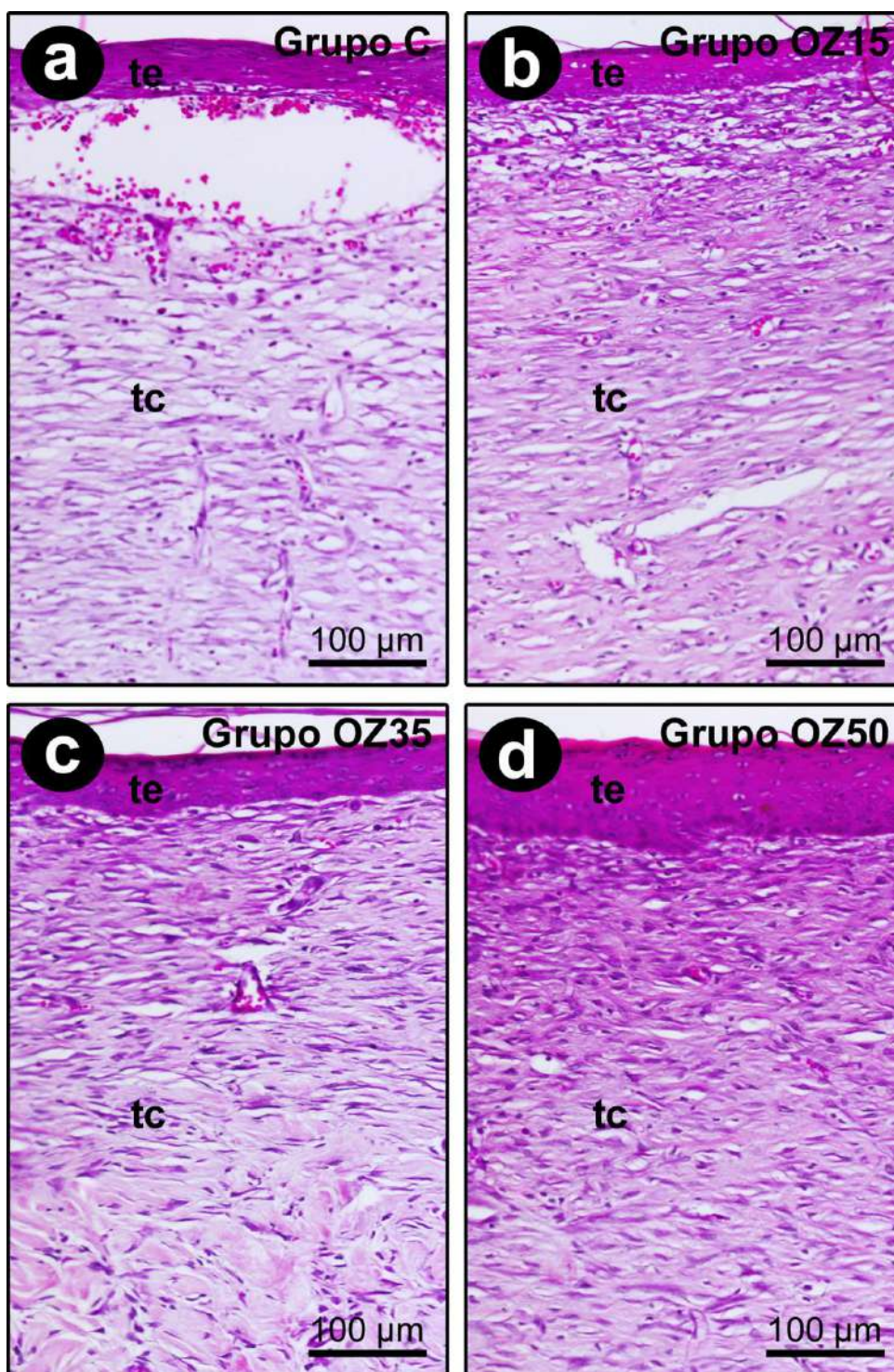


Figura 5 Aspecto histológico da pele aos 14 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrografias evidenciando as características histológicas do tecido epitelial e do tecido conjuntivo situado no centro da ferida cirúrgica grupos C (a), OZ15 (b), OZ35 (c) e OZ50 (d) aos 14 pós-operatórios. Abreviações e símbolos: te, tecido epitelial; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 μm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

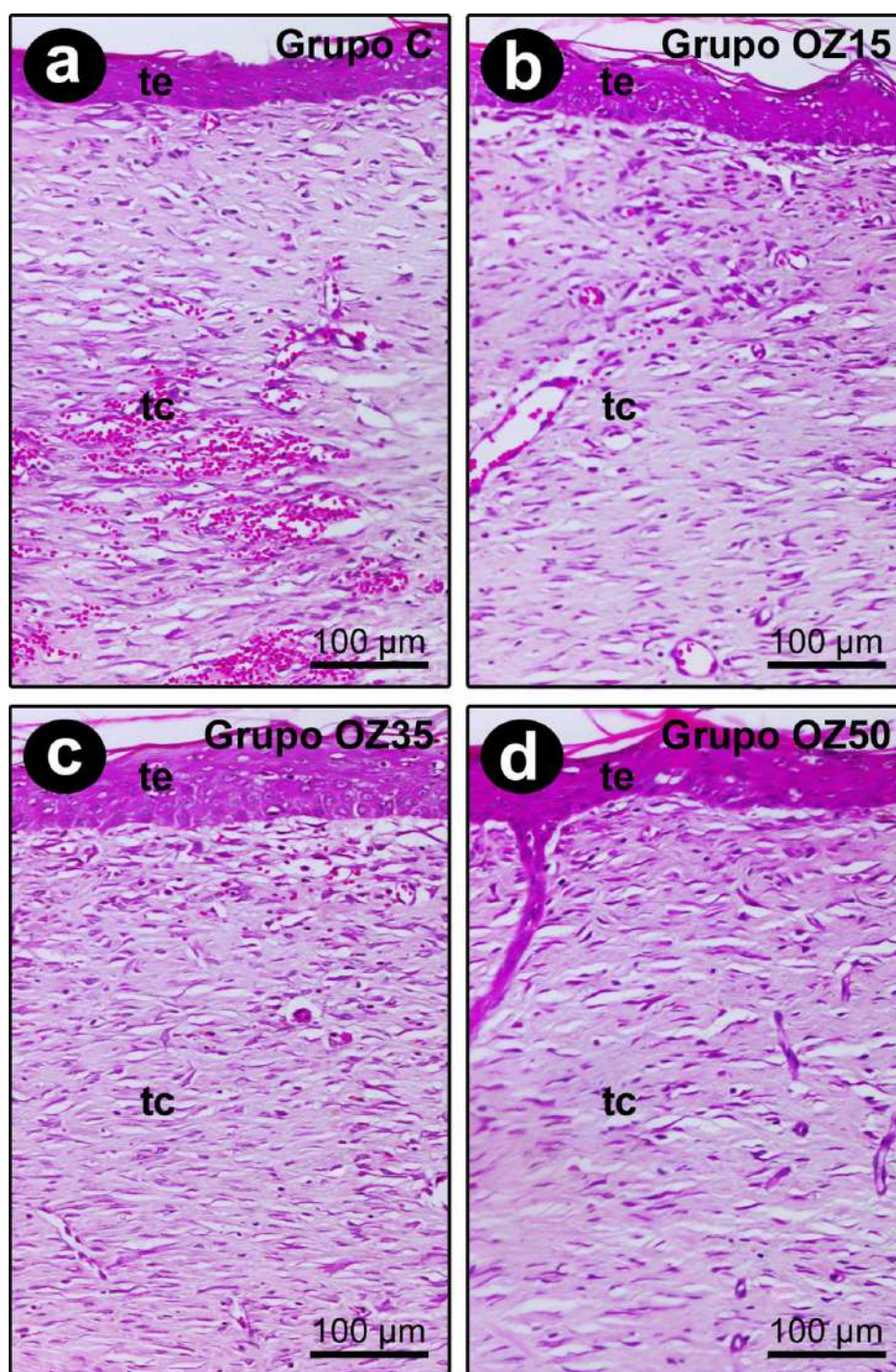


Figura 6 Aspecto histológico da pele aos 21 dias pós-operatórios nos diferentes grupos experimentais. Fotomicrograficas evidenciando as características histológicas do tecido epitelial e do tecido conjuntivo situado no centro da ferida cirúrgica grupos C (a), OZ15 (b), OZ35 (c) e OZ50 (d) aos 7 pós-operatórios. Abreviações e símbolos: te, tecido epitelial; tc, tecido conjuntivo. Aumento original: 200x. Barras de escala: 100 μm. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E).

Área ocupada por tecido epitelial (ATE) na ferida cirúrgica

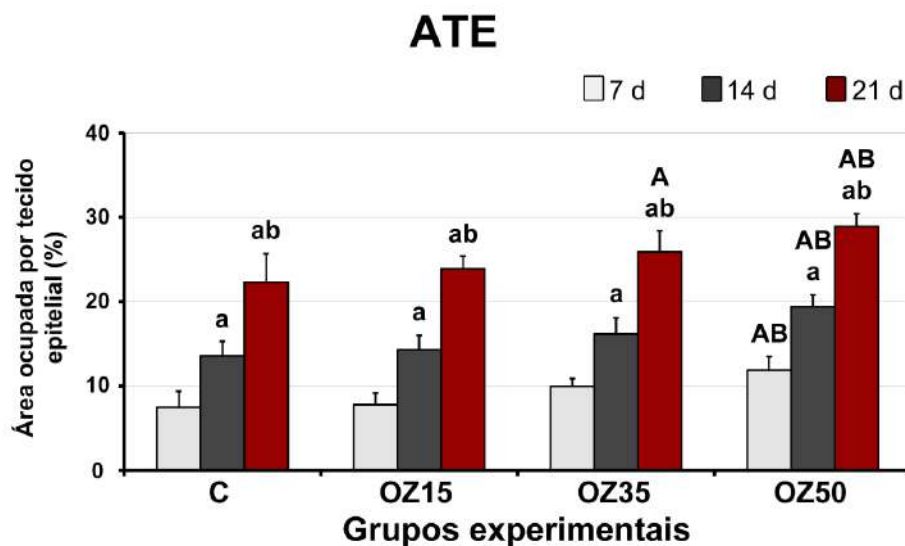


Figura 7 Gráfico evidenciando a área ocupada por tecido epitelial (ATE) nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. Símbolos: **a**, diferença em relação aos 7 dias no mesmo grupo; **b**, diferença em relação aos 14 dias no mesmo grupo; **A**, diferença em relação ao grupo C no mesmo período; **B**, diferença em relação ao grupo OZ15 no mesmo período. Testes estatísticos: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey.

Superfície recoberta por tecido epitelial (STE) na ferida cirúrgica

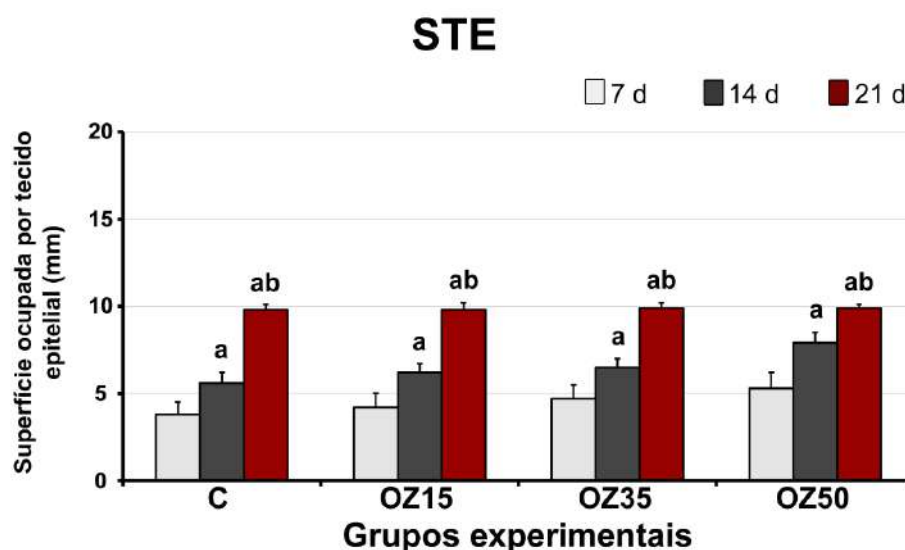


Figura 8 Gráfico evidenciando a superfície recoberta por tecido epitelial (STE) nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. Símbolos: **a**, diferença em relação aos 7 dias no mesmo grupo; **b**, diferença em relação aos 14 dias no mesmo grupo. Testes estatísticos: Análise de Variância de Kruskal Wallis; Pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Quantidade de células inflamatórias (CI) no tecido conjuntivo da ferida cirúrgica

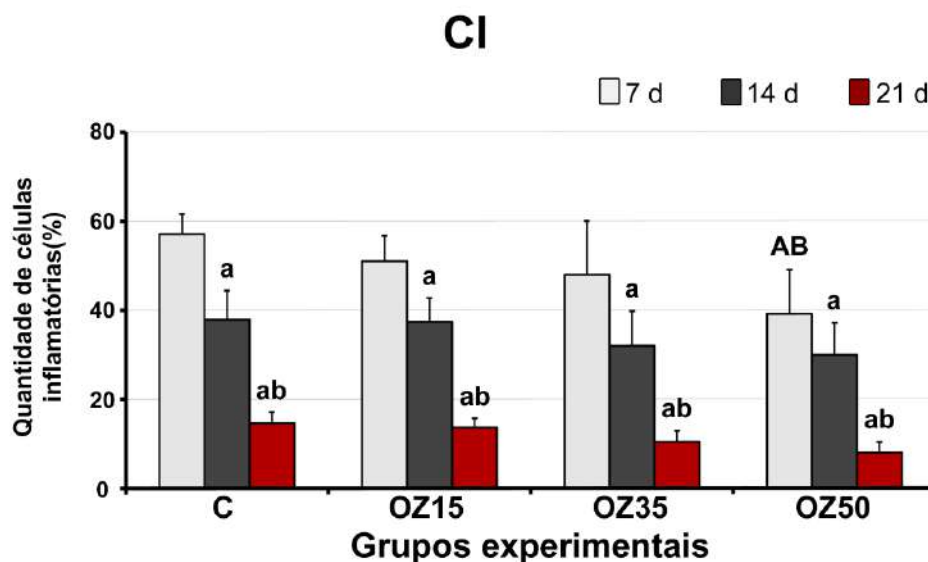


Figura 9 Gráfico evidenciando a quantidade de células inflamatórias (CI) no tecido conjuntivo nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. Símbolos: **a**, diferença em relação aos 7 dias no mesmo grupo; **b**, diferença em relação aos 14 dias no mesmo grupo; **A**, diferença em relação ao grupo C no mesmo período; **B**, diferença em relação ao grupo OZ15 no mesmo período. Testes estatísticos: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey

Área ocupada por fibras colágenas (AFC) no tecido conjuntivo da ferida cirúrgica

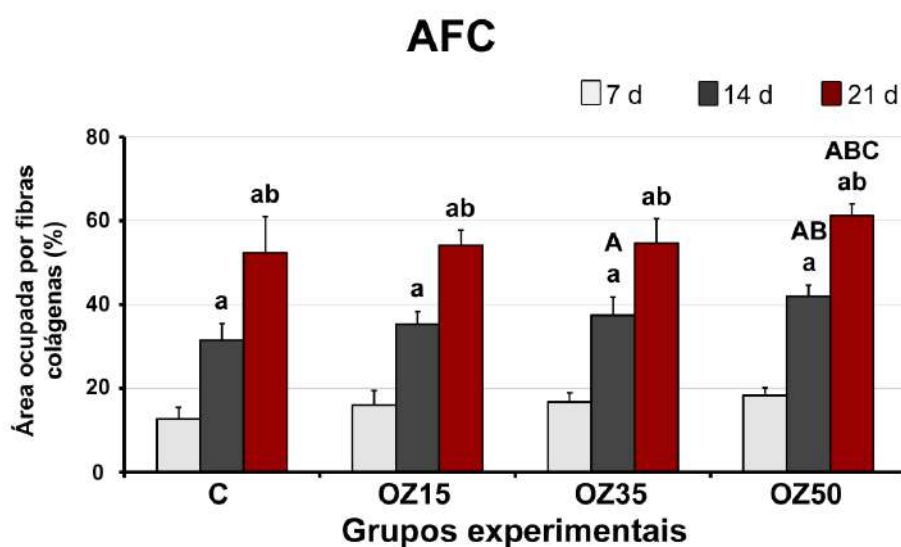


Figura 10 Gráfico evidenciando a área ocupada por fibras colágenas (AFC) no tecido conjuntivo nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. Símbolos: **a**, diferença em relação aos 7 dias no mesmo grupo; **b**, diferença em relação aos 14 dias no mesmo grupo; **A**, diferença em relação ao grupo C no mesmo

período; **B**, diferença em relação ao grupo OZ15 no mesmo período; **C**, diferença em relação ao grupo OZ35 no mesmo período. Testes estatísticos: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey.

Avaliação histométrica

Inicialmente foi avaliado o grau de confiabilidade entre os avaliadores sendo obtido o grau de correlação interclasse (CCI) de 0,960 considerado excelente (CCI 0,75 – 1,00) o que demonstra que os avaliadores reproduziram as medidas com excelente confiabilidade dos dados. Foi aplicado o teste de comparações múltiplas paramétricas dois a dois grupos de Games Howell para variâncias heterogêneas com $p < 0,05$ indicando diferença estatisticamente significativa entre dois grupos comparados (Figura 11),

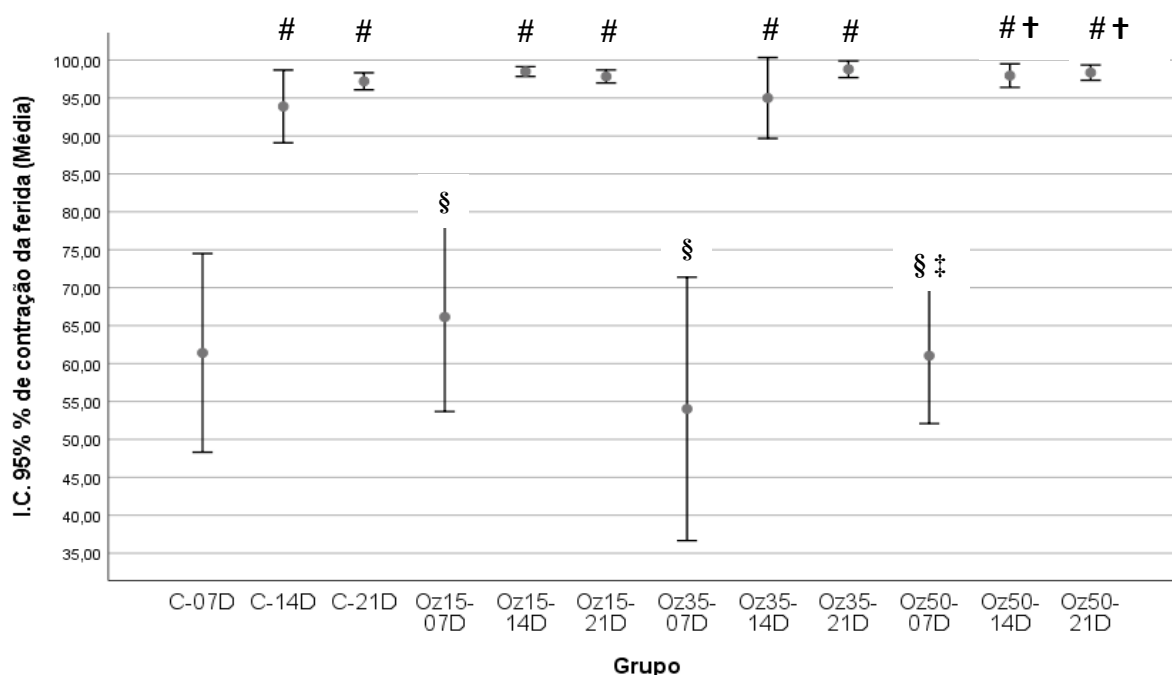


Figura 11 Gráfico evidenciando avaliação da contração das feridas nos grupos C, OZ15, OZ35, OZ50 nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Símbolos: # - diferença estatisticamente significativa no período de 14 e 21 dias comparado aos 7 dias, no mesmo grupo; \$ - diferença estatisticamente significativa entre os grupos OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7 dias em relação ao grupo C aos 14 e 21 dias; ‡ - diferença estatisticamente significativa entre os grupos OZ50 aos 7 dias em relação aos grupos C, OZ15 e OZ35 aos 14 e 21 dias; † - diferença estatisticamente significativa entre os grupos OZ50 aos 14 e 21 dias em relação aos grupos C, OZ15 e OZ35 aos 7 dias

Avaliação Imunoistoquímica

Padrão de imunomarcção do Fator de crescimento transformador Beta1 (TGF β 1) na ferida cirúrgica

A análise imunoistoquímica do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF β 1) revelou que houve no grupo C, OZ15 e OZ35 no período de 21 dias, maior imunomarcção comparado ao período de 7 dias, no mesmo grupo; que no grupo OZ35 aos 14 dias e OZ50 nos períodos de 7 e 14 dias houve maior imunomarcção que o grupo C, no mesmo período; que no grupo OZ50 no período de 7 e 14 dias houve maior imunomarcção que o grupo OZ15, no mesmo período (Figura 12).

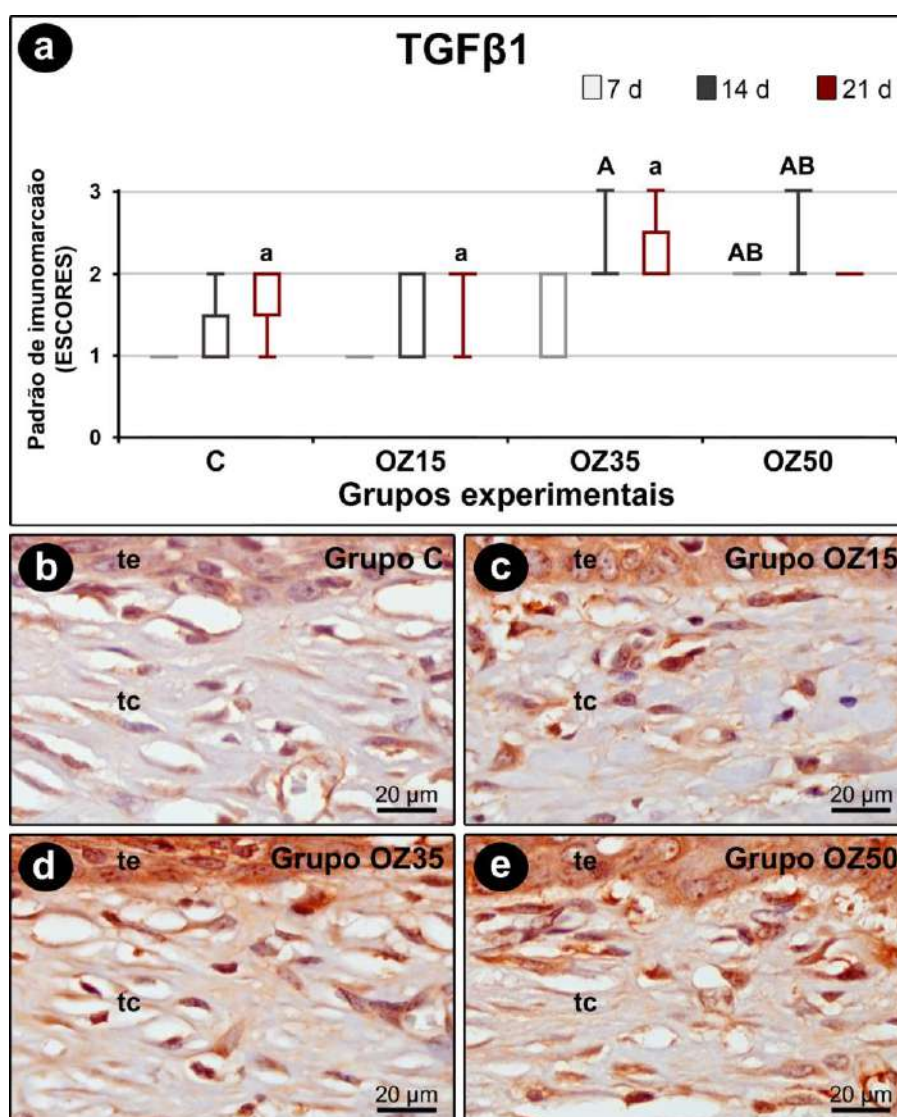


Figura 12. Imunomarcção para TGF β 1 na pele nos diferentes grupos experimentais. **(a)** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção para TGF β 1 na ferida cirúrgica nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. Testes estatísticos: Análise de Variância de Kruskal Wallis; Pós-teste de Student-Newman-Keuls. **(b – e)** Fotomicrográficas evidenciando o padrão de imunomarcção para TGF β 1 na base do tecido epitelial e no tecido conjuntivo situado no centro da ferida cirúrgica nos grupo C **(b)**, OZ15 **(c)**, OZ35 **(d)** e OZ50 **(e)** aos 14 pós-operatórios. Abreviações e símbolos: te, tecido epitelial; tc, tecido conjuntivo; **a**, diferença em relação aos 7 dias no mesmo grupo; **B**, diferença em relação ao grupo OZ15 no mesmo período. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 μ m. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

Padrão de imunomarcção do Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) na ferida cirúrgica

A análise imunoistoquímica do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) revelou que houve maior imunomarcção de VEGF nos grupos C e OZ15 nos períodos de 14 e 21 dias, quando comparado aos 7 dias, no mesmo grupo; maior imunomarcção de VEGF nos grupos OZ35 aos 7 dias e OZ50, nos períodos de 7 e 14 dias, quando comparado ao grupo C, no mesmo período (Figura 13).

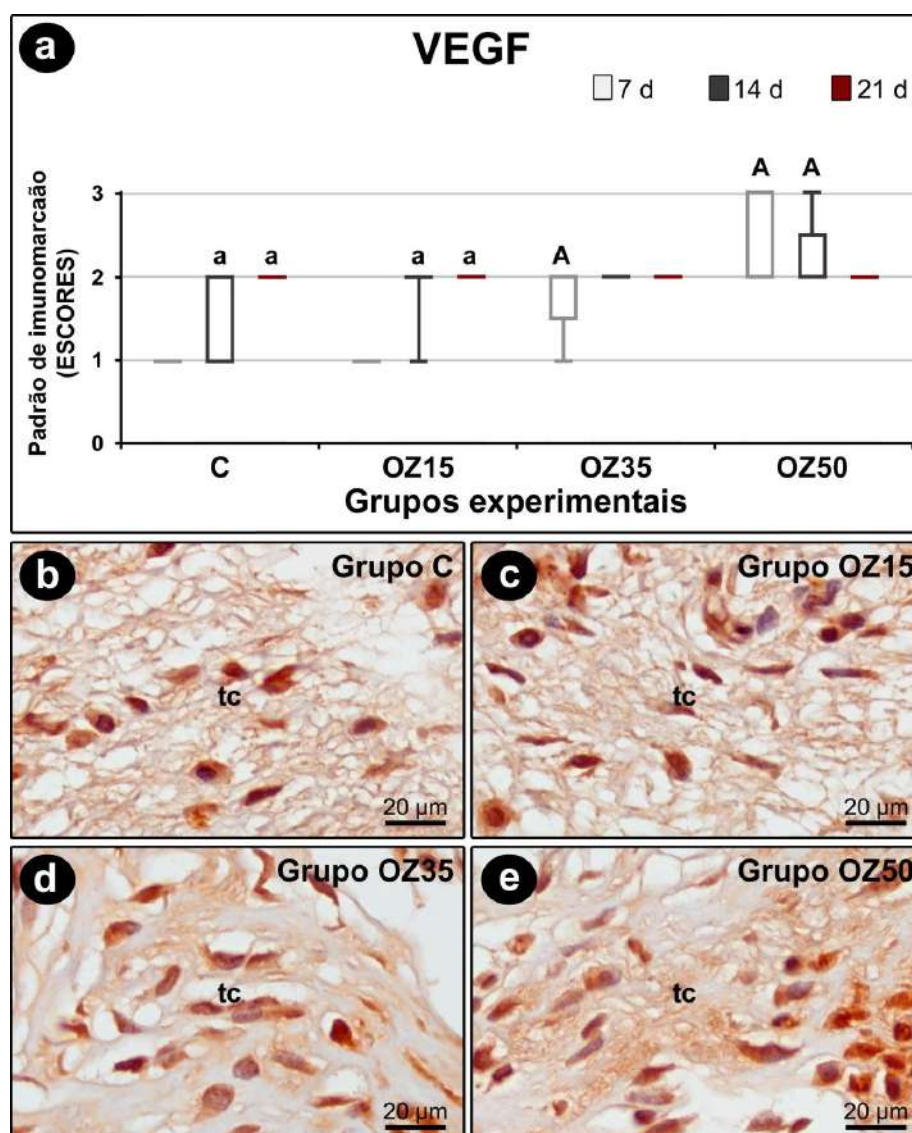


Figura 13 Imunomarcção para VEGF na pele nos diferentes grupos experimentais. **(a)** Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF na ferida cirúrgica nos grupos C, OZ15, OZ35 e OZ50 aos 7, 14 e 21 dias pós operatórios. Testes estatísticos: Análise de Variância de Kruskal Wallis; Pós-teste de Student-Newman-Keuls. **(b – e)** Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para VEGF no tecido conjuntivo situado no centro da ferida cirúrgica nos grupo C **(b)**, OZ15 **(c)**, OZ35 **(d)** e OZ50 **(e)** aos 14 pós-operatórios. Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; **a**, diferença em relação aos 7 dias no mesmo grupo; **A**, diferença em relação ao grupo C no mesmo período. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou do ponto de vista clínico, histológico, histométrico e imunoistoquímico os efeitos do O₃ e a influência da dose no processo de reparação tecidual em feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos. Os resultados deste estudo comprovaram a ação benéfica da mistura de O₃/O₂ na estimulação dos eventos da reparação tecidual como

também demonstrou que a dose poderá influenciar a resposta tecidual em feridas provocadas no dorso de ratos. Alguns pontos devem ser destacados entre estes o modelo experimental empregado no presente estudo. Foi utilizado ratos por tratar-se de um animal de pequeno porte, de fácil manuseio, manutenção, custo reduzido e muito utilizado em diferentes estudos sobre reparação cutânea (Garcia, 1992, Pessoa et al., 2004, Rezende et al., 2007). O modelo de reparação em feridas cutâneas é um modelo consagrado na literatura sendo apresentado por Mester et al. (1963) que, ao longo dos anos, tem sido muito utilizado para avaliar efeitos de tratamentos locais e sistêmicos (Garcia, 1992, Pessoa et al., 2004, Rezende et al., 2007, Karsidag et al., 2010, Fronza et al., 2014, Mohanty & Sahoo 2017, Bilgic 2021, Guillen et al., 2023).

Os resultados do presente estudo revelaram do ponto de vista clínico que as feridas tratadas com ozônio demonstraram crosta seca, com maior contração que as controles em todos períodos experimentais, em especial as dos grupos OZ35 e OZ50 nos períodos de 14 e 21 dias. Estes resultados são corroborados pelo resultado histométrico o qual evidenciou que as feridas tratadas com OZ50 aos 14 e 21 dias foram as que demonstraram maior contração em relação às dos grupos C, OZ15 e OZ35, aos 7 dias. A contração das feridas é determinada por uma forma especializada de fibroblasto que possui filamentos de actina, miosina e actina muscular α -liso (α -SMA) em seu citoplasma, denominados de "miofibroblastos" (Gabbiani et al., 1971, Majno et al., 1971) que possuem poder contrátil duas vezes maior que a dos fibroblastos normais (Wrobel et al., 2001). Esta diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos na área da lesão se deve principalmente à atividade do fator de crescimento transformador Beta1 (TGF- β 1) (Tai et al., 2021) que é liberado em grande quantidade pelas plaquetas quando ocorre o sangramento decorrente do procedimento cirúrgico enquanto que na reparação da ferida cirúrgica é produzido por leucócitos, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos atuando sobre

estas células para estimular a infiltração de células inflamatórias, fibroplasia, deposição da matriz e angiogênese na área (Werner & Grose, 2003).

Os resultados do nosso estudo evidenciaram maior padrão de imunomarcção do TGF- β 1 nos grupos OZ35 (14 dias) e OZ50 (7 e 14 dias) comparado ao controle nos mesmos períodos, como também, o grupo OZ50 aos 21 dias demonstrou maior a imunomarcção comparado ao grupo OZ15 no mesmo período. Esses achados permitem inferir que a dose de O₃/O₂ empregada nestes grupos foram adequadas para promoverem maior diferenciação celular que foi maior com doses mais elevadas.

Por outro lado a ruptura da rede vascular quando da injúria tecidual e o elevado consumo de oxigênio por células metabolicamente ativas da área, cria-se um ambiente com reduzido nível de oxigênio (hipóxia). Neste ambiente de hipóxia importantes citocinas são produzidas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β e VEGF que são promotores cruciais da proliferação celular, migração, quimiotaxia e angiogênese na cicatrização de feridas (Rodriguez et al., 2008, Schreml et al., 2010). Os resultados do presente estudo revelaram que a imunomarcção do fator VEGF mostrou-se maior nas feridas dos grupos OZ35 (7 dias) e Oz50 (7 e 14 dias) comparadas às do grupo controle, nos mesmos períodos. Este achado revela a capacidade da mistura O₃/O₂ empregada nestes grupos de promover maior angiogênese da área injuriada resultando benefícios na reparação tecidual, principalmente nos estágios iniciais do processo (7, 14 dias). Estudos demonstraram que há um aumento do fator VEGF nos primeiros períodos da reparação (1 a 7 dias) (Detmar et al. 1997) corroborando os achados de outros estudos que observaram aumento VEGF e do TGF- β 1 entre 5 a 7 dias após aplicação tópica de óleo ozonizado em feridas cutâneas (Kim et al., 2009).

Os eventos histológicos do presente estudo revelaram que as características histológicas dos grupos tratados com O₃ se mostraram muitos similares entre si, todavia, o grupo OZ50

apresentou alguns aspectos histológicos condizentes com um processo de reparação tecidual mais acelerado, tais como, espessura e padrão de celularidade da epiderme e quantidade de fibras colágenas na derme. Na avaliação da área ocupada pelo tecido epitelial (ATE) nota-se que a área foi maior nos grupos OZ35 (21 dias) e OZ50 em todos os períodos, comparado ao grupo controle nos mesmos períodos, demonstrando os efeitos benéficos do O₃ na diferenciação das células e migração epitelial. Ficou evidente também que houve uma redução da quantidade de células inflamatórias nos espécimes do grupo OZ50 no período de 7 dias, comparando-o com o grupo controle e com o grupo OZ15, no mesmo período, e que a área ocupada por fibras colágenas no tecido conjuntivo da ferida cirúrgica foi maior nos espécimes dos grupos OZ35 aos 14 dias, OZ50 aos 14 e 21 dias, comparando-os com os do grupo controle, nos mesmos períodos. Destaca-se também que os espécimes do grupo OZ50 demonstram diferenças significantes entre os espécimes do grupo OZ50 aos 14 e 21 dias comparado aos do grupo OZ15 no mesmos períodos e diferença maior no período de 21 dias comparado ao grupo OZ35 nos mesmos períodos, o que demonstra a influência da dose aplicada neste grupo OZ50 sobre a dos demais grupos, que foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório e ativar a formação colágena resultando uma migração epitelial diferenciada nestes grupos.

Embora com a metodologia empregada em nosso estudo não seja possível esclarecer os mecanismos de ação envolvidos nesta favorável resposta biológica sabe-se que o O₃ reage rapidamente com fluídos teciduais como a água e ácidos graxos polinsaturados resultando na formação de produtos lipídicos ozonizados e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Bocci et al., 2006). Além deste importante radical livre formado (H₂O₂) quando em contato com sangue há a decomposição do O₃ formando outras espécies reativas de oxigênio (ROS) como radical ânion superóxido (O₂⁻), o radical hidroxila (OH⁻) e óxido nítrico (ON) que em baixa concentração, atuam como vasodilatadores e estimulam importantes fatores endógenos de crescimento (Roy et al., 1981). Também estudos demonstraram que o O₃ ao atingir a membrana

celular forma ROS que ativam as vias do fator nuclear Kappa-B (NF-κB), uma importante proteínas de sinalização para o núcleo celular, que em consequência poderá promover a ativação de vias de citocinas pró e anti-inflamatórias intracelular (Manoto et al., 2018).

Deve ser destacado ainda que na avaliação das doses empregadas no presente estudo (15, 35 e 50µg/ml) os resultados obtidos demonstraram que todas influenciaram positivamente a reparação tecidual porém as doses que promoveram melhores resultados foram a de 35µg/ml e 50µg/ml. Nossos resultados corroboram os de outros estudos que demonstraram que a terapia com ozônio induz efeitos biológicos a partir de doses entre 20 e 40 µg/ml (Naik et al., 2016) como também com doses mais elevadas, de 50µg/ml (Pires et al., 2021).

A via de aplicação do ozônio mais utilizada é a da aplicação tópica quer empregando água ozonizada, óleo ozonizado, formulação em gel ou gás (Kim et al., 2009, Patel et al., 2012, Romary et al., 2023, Materni et al., 2023) enquanto que a via de administração sistêmica é empregada por injeção intramuscular (de Sire et al., 2021), subcutânea, intravenosa (An et al., 2018) sendo a de insuflação retal a de escolha em diferentes estudos (Fernández et al., 2008, Pires et al., 2021). No entanto, a via de administração intraperitoneal tem sido empregada na área médica para tratamento de diferentes patologias (Mete et al., 2017, Yan et al., 2022) e se mostrou efetiva no presente estudo para a promover estimulação dos eventos biológicos da reparação tecidual em pele, tornando-se uma mais uma opção de administração, principalmente para pesquisas em animais.

Desta forma os resultados obtidos confirmaram às hipóteses do estudo. Não foi observado limitações para a realização deste estudo porém por ser um estudo in vivo em animais os resultados obtidos devem ser considerados com cautela quando da extrapolação os para humanos. Sabe-se que a ozonioterapia constitui uma terapia adjuvante ou alternativa capaz de promover benefícios em diferentes indicações médicas e odontológicas, porém necessita de mais estudos principalmente estudos clínicos controlados randomizados, com elevado número

amostral e períodos de avaliação significativos para desenvolvimento de protocolos do seu uso clínico.

CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que o uso sistêmico do O₃ favoreceu o processo do reparo tecidual em feridas cutâneas de modo dependente; que a dose interfere na resposta biológica do tecido; que as concentrações de 35 µg e 50 µg de O₃ proporcionaram resultados benéficos, sendo que a concentração de 50 µg se mostrou a maior efetividade.

REFERÊNCIAS

Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg*. 2016 Sep;138(3 Suppl):18S-28S.

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997 Apr 4; 276(5309):75– 81.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2; 341(10):738–746.

Uccioli L, Izzo V, Meloni M, Vainieri E, Ruotolo V, Giurato L. Non-healing foot ulcers in diabetic patients: general and local interfering conditions and management options with advanced wound dressings. *J Wound Care*. 2015 Apr; 24(4 Suppl):35–42.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Am Physiol Soc*. 2003;83(3):835-870.

Colwell A, Beanes S, Soo C, et al. Increased angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor during scarless repair. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115(1):204-212
Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014 Dec 3.6(265):265sr266.

Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *The Journal of investigative dermatology*. 1996 Nov; 107(5):743–748.

Stojadinovic O, Pastar I, Nusbaum AG, Vukelic S, Krzyzanowska A, Tomic-Canic M. Deregulation of epidermal stem cell niche contributes to pathogenesis of nonhealing venous ulcers. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2014 Mar-Apr;22(2):220–227.

Düzgün E, Şahin T, Yeşiltaş SK, Alkan AA, Dikmen NT. Ozone-induced retinal vascular reactivity as assessed by optical coherence tomography angiography. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022 Sep;39:102957.

Toy S, Tuncer K, Topal M, Aydın A. Corticosteroid, Platelet-Rich Plasma, and Ozone Injections for Sinus Tarsi Syndrome. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2023 Jan-Feb;113(1):20-221.

Delgadillo-Valero LF, Hernández-Cruz EY, Pedraza-Chaverri J. The Protective Role of Ozone Therapy in Kidney Disease: A Review. *Life (Basel).* 2023 Mar 10;13(3):752.

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):1235-1252.

Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc.* 2018 Feb;81(2):94-101.

Hernández O, González, R. Ozonoterapia En Úlceras flebostáticasin: *Rev Cubana Cir* , 2001; 40(2):123-129.

Khan SA, Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med Gas Res.* 2019 Jul-Sep;9(3):163-7.

Wang X. Emerging roles of ozone in skin diseases. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2018;43(2):114-123

Khan SA, Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med Gas Res.* 2019 Jul-Sep;9(3):163-7.

Garcia VG. Comportamento de feridas cutâneas submetidas a ação do raio laser: estudo clínico, histológico e biométrico em ratos. Açatuba, Unesp.Tese Livre-Docência. Faculdade de Odontologia. 1992. p. 89.

Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg.* 2004 Jun;22(3):199-204.

Rezende SB, Ribeiro MS, Núñez SC, Garcia VG, Maldonado EP. Effects of a single near-infrared laser treatment on cutaneous wound healing: biometrical and histological study in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2007 Jun 26;87(3):145-53.

Mester E , Szende B , and Gartner P , The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol Radiother (Berl)*, 1968 9(5):621–6.

Karsidag T, Asensio JA, Kabukcuoglu F, Tuzun S. Preliminary study comparing the effects of locally and systemically applied L-carnitine on the healing of full-thickness skin defects. *Scand J Surg.* 2010;99(3):147-52.

Fronza M, Caetano GF, Leite MN, Bitencourt CS, Paula-Silva FW, Andrade TA, Frade MA, Merfort I, Faccioli LH. Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *PLoS One.* 2014 Nov 13;9(11):e112297.

Mohanty C, Sahoo SK. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discov Today*. 2017 Oct;22(10):1582-1592.

Bilgic T. Comparison of the Effect of Local and Systemic Injection of Resveratrol on Cutaneous Wound Healing in Rats. *Int J Low Extrem Wounds*. 2021 Mar;20(1):55-59.

Guillen MRS, Borges EL, Amorim GL, Vieira PC, Guedes ACM, Barcelos LS. The use of occlusive dressings: influence on excisional wound healing in animal model. *Acta Cir Bras*. 2023 Jan 13;37(12):e371206.

Gabbiani, G.; Ryan, G.B.; Majno, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971;27:549–550.

Majno, G.; Gabbiani, G.; Hirschel, B.J.; Ryan, G.B.; Statkov, P.R. Contraction of granulation tissue in vitro: Similarity to smooth muscle. *Science* 1971;173:548–550.

Wrobel, L.K.; Fray, T.R.; Molloy, J.E.; Adams, J.J.; Armitage, M.P.; Sparrow, J.C. Contractility of single human dermal myofibroblasts and fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskelet*. 2002, 52, 82–90.

Tai Y, Woods EL, Dally J, Kong D, Steadman R, Moseley R, Midgley AC. Myofibroblasts: Function, Formation, and Scope of Molecular Therapies for Skin Fibrosis. *Biomolecules*. 2021 Jul 23;11(8):1095.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):835-70.

Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg* 34:1159-1169

Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol*. 2010;163:257-68. 26.

Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 263-8.

Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci*. 2009 Jun;24(3):368-74.

Bocci, V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch. Med. Res*. 2006, 37, 425–435

Manoto SL, Maepa MJ, Motaung SK. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25:672-679.

Naik SV, K R, Kohli S, Zohabhasan S, Bhatia S. Ozone- A Biological Therapy in Dentistry- Reality or Myth????? Open Dent J. 2016 May 11;10:196-206.

Pires JR, Karam AM, Garcia VG, Ribeiro FS, Pontes AEF, Andrade CR, et al. Effect of systemic ozone therapy as a biomodulator of tissue regeneration and inflammatory response in rats. Rev Odontol UNESP. 2021;50:e20210046.

Patel PV, Kumar S, Vidya GD, Patel A, Holmes JC, Kumar V. Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: an eighteen-month randomized controlled clinical trial. Acta Cytol. 2012;56:277-284

Materni A, Pasquale C, Longo E, Frosecchi M, Benedicenti S, Bozzo M, Amaroli A. Prevention of Dry Socket with Ozone Oil-Based Gel after Inferior Third Molar Extraction: A Double-Blind Split-Mouth Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. Gels. 2023 Apr 1;9(4):289.

de Sire A, Agostini F, Lippi L, Mangone M, Marchese S, Cisari C, Bernetti A, Invernizzi M. Oxygen-Ozone Therapy in the Rehabilitation Field: State of the Art on Mechanisms of Action, Safety and Effectiveness in Patients with Musculoskeletal Disorders. Biomolecules. 2021 Feb 26;11(3):356.

An Y, Liu WJ, Xue P, Ma Y, Zhang LQ, Zhu B, Qi M, Li LY, Zhang YJ, Wang QT, Jin Y. Autophagy promotes MSC-mediated vascularization in cutaneous wound healing via regulation of VEGF secretion. Cell Death Dis. 2018 Jan 19;9(2):58.

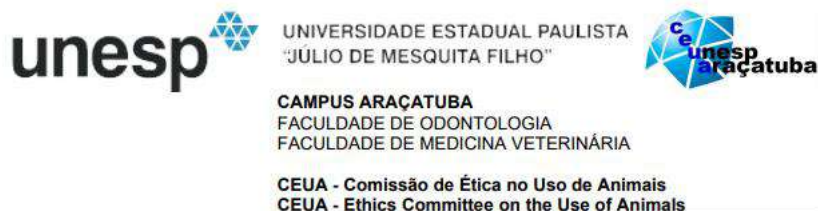
Fernández OSL, Ajamieh HH, Berlanga J, Menéndez S, Viebahn-Hánsler R, Re L, et al. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/ reperfusion. Transpl Int. 2008 Feb;21(1):39-48.

Mete F, Tarhan H, Celik O, Akarken I, Vural K, Ekin RG, Aydemir I, Ilbey YO. Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. Asian J Androl. 2017 Jan-Feb;19(1):43-46.

Yan YN, Williams JP, Niu K, Zhang WH, Zhang JF, Shi L, An JX. Intraperitoneal ozone injection prevents REM sleep deprivation - induced spatial learning and memory deficits by suppressing the expression of *Sema3A* in the hippocampus in rats. Iran J Basic Med Sci. 2022 Aug;25(8):980-988.

ANEXO 1

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL



CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado "**Efeitos da ozonioterapia sistêmica na reparação de feridas cutâneas em ratos**", Processo FOA nº 2021-287, sob responsabilidade de Valdir Gouveia Garcia e colaboração de Letícia Helena Theodoro, Edilson Ervolino e Janderson Cardoso foi aprovado pela CEUA em 28 de Fevereiro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Effects of systemic ozonotherapy on the repair of skin wounds in rats**", Process FOA nº 2021-287, under the supervision of Valdir Gouveia Garcia and collaboration of Letícia Helena Theodoro, Edilson Ervolino and Janderson Cardoso had its the Final Report approved by the CEUA on February 28, 2023.

Prof. Assoc. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO 2

**AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS FERIDAS
ÁREA OCUPADA POR TECIDO EPITELIAL (ATE) NA FERIDA CIRÚRGICA**

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	11	39.9 e+02	362,762
Erro	72	256,374	3,561
F =	101,8778		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	7,4529		
Média (Coluna 2) =	13,6443		
Média (Coluna 3) =	22,2643		
Média (Coluna 4) =	7,8314		
Média (Coluna 5) =	14,3471		
Média (Coluna 6) =	23,94		
Média (Coluna 7) =	9,9757		
Média (Coluna 8) =	16,17		
Média (Coluna 9) =	25,86		
Média (Coluna 10) =	11,9257		
Média (Coluna 11) =	19,4086		
Média (Coluna 12) =	28,8757		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	6,1914	8,681	< 0.01
Médias (1 a 3) =	14,8114	20,7671	< 0.01
Médias (1 a 4) =	0,3786	0,5308	ns
Médias (1 a 5) =	6,8943	9,6665	< 0.01
Médias (1 a 6) =	16,4871	23,1166	< 0.01
Médias (1 a 7) =	2,5229	3,5373	ns
Médias (1 a 8) =	8,7171	12,2223	< 0.01
Médias (1 a 9) =	18,4071	25,8086	< 0.01
Médias (1 a 10) =	4,4729	6,2714	< 0.01
Médias (1 a 11) =	11,9557	16,7631	< 0.01
Médias (1 a 12) =	21,4229	30,0369	< 0.01
Médias (2 a 3) =	8,62	12,0861	< 0.01
Médias (2 a 4) =	5,8129	8,1502	< 0.01
Médias (2 a 5) =	0,7029	0,9855	ns

Médias (2 a 6) =	10,2957	14,4356	< 0.01
Médias (2 a 7) =	3,6686	5,1437	< 0.05
Médias (2 a 8) =	2,5257	3,5413	ns
Médias (2 a 9) =	12,2157	17,1276	< 0.01
Médias (2 a 10) =	1,7186	2,4096	ns
Médias (2 a 11) =	5,7643	8,0821	< 0.01
Médias (2 a 12) =	15,2314	21,3559	< 0.01
Médias (3 a 4) =	14,4329	20,2363	< 0.01
Médias (3 a 5) =	7,9171	11,1006	< 0.01
Médias (3 a 6) =	1,6757	2,3495	ns
Médias (3 a 7) =	12,2886	17,2298	< 0.01
Médias (3 a 8) =	6,0943	8,5448	< 0.01
Médias (3 a 9) =	3,5957	5,0415	< 0.05
Médias (3 a 10) =	10,3386	14,4957	< 0.01
Médias (3 a 11) =	2,8557	4,004	ns
Médias (3 a 12) =	6,6114	9,2699	< 0.01
Médias (4 a 5) =	6,5157	9,1357	< 0.01
Médias (4 a 6) =	16,1086	22,5858	< 0.01
Médias (4 a 7) =	2,1443	3,0065	ns
Médias (4 a 8) =	8,3386	11,6915	< 0.01
Médias (4 a 9) =	18,0286	25,2778	< 0.01
Médias (4 a 10) =	4,0943	5,7406	< 0.01
Médias (4 a 11) =	11,5771	16,2323	< 0.01
Médias (4 a 12) =	21,0443	29,5061	< 0.01
Médias (5 a 6) =	9,5929	13,4501	< 0.01
Médias (5 a 7) =	4,3714	6,1292	< 0.01
Médias (5 a 8) =	1,8229	2,5558	ns
Médias (5 a 9) =	11,5129	16,1421	< 0.01
Médias (5 a 10) =	2,4214	3,3951	ns
Médias (5 a 11) =	5,0614	7,0966	< 0.01
Médias (5 a 12) =	14,5286	20,3705	< 0.01
Médias (6 a 7) =	13,9643	19,5793	< 0.01
Médias (6 a 8) =	7,77	10,8943	< 0.01
Médias (6 a 9) =	1,92	2,692	ns
Médias (6 a 10) =	12,0143	16,8452	< 0.01
Médias (6 a 11) =	4,5314	6,3535	< 0.01
Médias (6 a 12) =	4,9357	6,9203	< 0.01
Médias (7 a 8) =	6,1943	8,685	< 0.01
Médias (7 a 9) =	15,8843	22,2713	< 0.01
Médias (7 a 10) =	1,95	2,7341	ns
Médias (7 a 11) =	9,4329	13,2258	< 0.01
Médias (7 a 12) =	18,9	26,4996	< 0.01
Médias (8 a 9) =	9,69	13,5863	< 0.01
Médias (8 a 10) =	4,2443	5,9509	< 0.01

Médias (8 a 11) =	3,2386	4,5408	ns
Médias (8 a 12) =	12,7057	17,8146	< 0.01
Médias (9 a 10) =	13,9343	19,5372	< 0.01
Médias (9 a 11) =	6,4514	9,0455	< 0.01
Médias (9 a 12) =	3,0157	4,2283	ns
Médias (10 a 11) =	7,4829	10,4917	< 0.01
Médias (10 a 12) =	16,95	23,7655	< 0.01
Médias (11 a 12) =	9,4671	13,2739	< 0.01

**SUPERFÍCIE RECOBERTA POR TECIDO EPITELIAL (STE) NA FERIDA
CIRÚRGICA**

	Resultados	- 2 -
H =	75,4146	
Graus de liberdade =	11	
(p) Kruskal-Wallis =	0	
R 1 (posto médio) =	8,7857	
R 2 (posto médio) =	30,4286	
R 3 (posto médio) =	69,8571	
R 4 (posto médio) =	12,2143	
R 5 (posto médio) =	39,6429	
R 6 (posto médio) =	69,7143	
R 7 (posto médio) =	17,5714	
R 8 (posto médio) =	40,9286	
R 9 (posto médio) =	71,8571	
R 10 (posto médio) =	25,7143	
R 11 (posto médio) =	52,7143	
R 12 (posto médio) =	70,5714	
Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	21,6429	0,0969
Grupos (1 e 3) =	61,0714	< 0.0001
Grupos (1 e 4) =	3,4286	0,7926
Grupos (1 e 5) =	30,8571	0,018
Grupos (1 e 6) =	60,9286	< 0.0001
Grupos (1 e 7) =	8,7857	0,5004
Grupos (1 e 8) =	32,1429	0,0137
Grupos (1 e 9) =	63,0714	< 0.0001

Grupos (1 e 10) =	16,9286	0,1942
Grupos (1 e 11) =	43,9286	0,0008
Grupos (1 e 12) =	61,7857	< 0.0001
Grupos (2 e 3) =	39,4286	0,0025
Grupos (2 e 4) =	18,2143	0,1624
Grupos (2 e 5) =	9,2143	0,4798
Grupos (2 e 6) =	39,2857	0,0026
Grupos (2 e 7) =	12,8571	0,3241
Grupos (2 e 8) =	10,5	0,4206
Grupos (2 e 9) =	41,4286	0,0015
Grupos (2 e 10) =	4,7143	0,7177
Grupos (2 e 11) =	22,2857	0,0874
Grupos (2 e 12) =	40,1429	0,0021
Grupos (3 e 4) =	57,6429	< 0.0001
Grupos (3 e 5) =	30,2143	0,0205
Grupos (3 e 6) =	0,1429	0,9913
Grupos (3 e 7) =	52,2857	< 0.0001
Grupos (3 e 8) =	28,9286	0,0265
Grupos (3 e 9) =	2	0,8781
Grupos (3 e 10) =	44,1429	0,0007
Grupos (3 e 11) =	17,1429	0,1886
Grupos (3 e 12) =	0,7143	0,9563
Grupos (4 e 5) =	27,4286	0,0354
Grupos (4 e 6) =	57,5	< 0.0001
Grupos (4 e 7) =	5,3571	0,6812
Grupos (4 e 8) =	28,7143	0,0276
Grupos (4 e 9) =	59,6429	< 0.0001
Grupos (4 e 10) =	13,5	0,3005
Grupos (4 e 11) =	40,5	0,0019
Grupos (4 e 12) =	58,3571	< 0.0001
Grupos (5 e 6) =	30,0714	0,0211
Grupos (5 e 7) =	22,0714	0,0905
Grupos (5 e 8) =	1,2857	0,9214
Grupos (5 e 9) =	32,2143	0,0135
Grupos (5 e 10) =	13,9286	0,2854
Grupos (5 e 11) =	13,0714	0,3161
Grupos (5 e 12) =	30,9286	0,0177
Grupos (6 e 7) =	52,1429	< 0.0001
Grupos (6 e 8) =	28,7857	0,0273
Grupos (6 e 9) =	2,1429	0,8695
Grupos (6 e 10) =	44	0,0007
Grupos (6 e 11) =	17	0,1923
Grupos (6 e 12) =	0,8571	0,9476
Grupos (7 e 8) =	23,3571	0,0732

Grupos (7 e 9) =	54,2857	< 0.0001
Grupos (7 e 10) =	8,1429	0,5323
Grupos (7 e 11) =	35,1429	0,007
Grupos (7 e 12) =	53	< 0.0001
Grupos (8 e 9) =	30,9286	0,0177
Grupos (8 e 10) =	15,2143	0,2433
Grupos (8 e 11) =	11,7857	0,366
Grupos (8 e 12) =	29,6429	0,023
Grupos (9 e 10) =	46,1429	0,0004
Grupos (9 e 11) =	19,1429	0,1421
Grupos (9 e 12) =	1,2857	0,9214
Grupos (10 e 11) =	27	0,0384
Grupos (10 e 12) =	44,8571	0,0006
Grupos (11 e 12) =	17,8571	0,1708

**QUANTIDADE DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS (CI) NO TECIDO CONJUNTIVO
DA FERIDA CIRÚRGICA**

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	11	21.3 e+03	19.4 e+02
Erro	72	30.0 e+02	41,694
F =	46,4956		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	57,1429		
Média (Coluna 2) =	37,8571		
Média (Coluna 3) =	14,5714		
Média (Coluna 4) =	51		
Média (Coluna 5) =	37,4286		
Média (Coluna 6) =	13,5714		
Média (Coluna 7) =	47,8571		
Média (Coluna 8) =	31,8571		
Média (Coluna 9) =	10,4286		
Média (Coluna 10) =	39,1429		
Média (Coluna 11) =	29,8571		
Média (Coluna 12) =	8		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	19,2857	7,9022	< 0.01
Médias (1 a 3) =	42,5714	17,4433	< 0.01

Médias (1 a 4) =	6,1429	2,517	ns
Médias (1 a 5) =	19,7143	8,0778	< 0.01
Médias (1 a 6) =	43,5714	17,853	< 0.01
Médias (1 a 7) =	9,2857	3,8047	ns
Médias (1 a 8) =	25,2857	10,3606	< 0.01
Médias (1 a 9) =	46,7143	19,1408	< 0.01
Médias (1 a 10) =	18	7,3753	< 0.01
Médias (1 a 11) =	27,2857	11,1801	< 0.01
Médias (1 a 12) =	49,1429	20,1359	< 0.01
Médias (2 a 3) =	23,2857	9,5411	< 0.01
Médias (2 a 4) =	13,1429	5,3852	< 0.05
Médias (2 a 5) =	0,4286	0,1756	ns
Médias (2 a 6) =	24,2857	9,9509	< 0.01
Médias (2 a 7) =	10	4,0974	ns
Médias (2 a 8) =	6	2,4584	ns
Médias (2 a 9) =	27,4286	11,2386	< 0.01
Médias (2 a 10) =	1,2857	0,5268	ns
Médias (2 a 11) =	8	3,2779	ns
Médias (2 a 12) =	29,8571	12,2337	< 0.01
Médias (3 a 4) =	36,4286	14,9263	< 0.01
Médias (3 a 5) =	22,8571	9,3655	< 0.01
Médias (3 a 6) =	1	0,4097	ns
Médias (3 a 7) =	33,2857	13,6385	< 0.01
Médias (3 a 8) =	17,2857	7,0827	< 0.01
Médias (3 a 9) =	4,1429	1,6975	ns
Médias (3 a 10) =	24,5714	10,0679	< 0.01
Médias (3 a 11) =	15,2857	6,2632	< 0.01
Médias (3 a 12) =	6,5714	2,6926	ns
Médias (4 a 5) =	13,5714	5,5608	< 0.05
Médias (4 a 6) =	37,4286	15,336	< 0.01
Médias (4 a 7) =	3,1429	1,2878	ns
Médias (4 a 8) =	19,1429	7,8436	< 0.01
Médias (4 a 9) =	40,5714	16,6238	< 0.01
Médias (4 a 10) =	11,8571	4,8584	< 0.05
Médias (4 a 11) =	21,1429	8,6631	< 0.01
Médias (4 a 12) =	43	17,6189	< 0.01
Médias (5 a 6) =	23,8571	9,7753	< 0.01
Médias (5 a 7) =	10,4286	4,273	ns
Médias (5 a 8) =	5,5714	2,2828	ns
Médias (5 a 9) =	27	11,063	< 0.01
Médias (5 a 10) =	1,7143	0,7024	ns
Médias (5 a 11) =	7,5714	3,1023	ns
Médias (5 a 12) =	29,4286	12,0581	< 0.01
Médias (6 a 7) =	34,2857	14,0483	< 0.01

Médias (6 a 8) =	18,2857	7,4924	< 0.01
Médias (6 a 9) =	3,1429	1,2878	ns
Médias (6 a 10) =	25,5714	10,4777	< 0.01
Médias (6 a 11) =	16,2857	6,6729	< 0.01
Médias (6 a 12) =	5,5714	2,2828	ns
Médias (7 a 8) =	16	6,5559	< 0.01
Médias (7 a 9) =	37,4286	15,336	< 0.01
Médias (7 a 10) =	8,7143	3,5706	ns
Médias (7 a 11) =	18	7,3753	< 0.01
Médias (7 a 12) =	39,8571	16,3311	< 0.01
Médias (8 a 9) =	21,4286	8,7802	< 0.01
Médias (8 a 10) =	7,2857	2,9853	ns
Médias (8 a 11) =	2	0,8195	ns
Médias (8 a 12) =	23,8571	9,7753	< 0.01
Médias (9 a 10) =	28,7143	11,7654	< 0.01
Médias (9 a 11) =	19,4286	7,9607	< 0.01
Médias (9 a 12) =	2,4286	0,9951	ns
Médias (10 a 11) =	9,2857	3,8047	ns
Médias (10 a 12) =	31,1429	12,7605	< 0.01
Médias (11 a 12) =	21,8571	8,9558	< 0.01

**ÁREA OCUPADA POR FIBRAS COLÁGENAS (AFC) NO TECIDO CONJUNTIVO
DA FERIDA CIRÚRGICA**

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	11	26.5 e+03	24.1 e+02
Erro	84	14.1 e+02	16,832
F =	143,0262		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	12,235		
Média (Coluna 2) =	30,6		
Média (Coluna 3) =	51,2825		
Média (Coluna 4) =	15,4938		
Média (Coluna 5) =	35,2788		
Média (Coluna 6) =	54,1113		
Média (Coluna 7) =	16,6738		
Média (Coluna 8) =	38,0213		
Média (Coluna 9) =	54,5913		
Média (Coluna 10) =	18,395		
Média (Coluna 11) =	42,3875		
Média (Coluna 12) =	61,6888		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	18,365	12,6609	< 0.01
Médias (1 a 3) =	39,0475	26,9194	< 0.01
Médias (1 a 4) =	3,2588	2,2466	ns
Médias (1 a 5) =	23,0438	15,8864	< 0.01
Médias (1 a 6) =	41,8763	28,8695	< 0.01
Médias (1 a 7) =	4,4388	3,0601	ns
Médias (1 a 8) =	25,7863	17,7771	< 0.01
Médias (1 a 9) =	42,3563	29,2004	< 0.01
Médias (1 a 10) =	6,16	4,2467	ns
Médias (1 a 11) =	30,1525	20,7872	< 0.01
Médias (1 a 12) =	49,4538	34,0935	< 0.01
Médias (2 a 3) =	20,6825	14,2585	< 0.01
Médias (2 a 4) =	15,1063	10,4143	< 0.01
Médias (2 a 5) =	4,6787	3,2255	ns
Médias (2 a 6) =	23,5113	16,2087	< 0.01
Médias (2 a 7) =	13,9263	9,6008	< 0.01
Médias (2 a 8) =	7,4213	5,1162	< 0.05
Médias (2 a 9) =	23,9913	16,5396	< 0.01

Médias (2 a 10) =	12,205	8,4141	< 0.01
Médias (2 a 11) =	11,7875	8,1263	< 0.01
Médias (2 a 12) =	31,0888	21,4326	< 0.01
Médias (3 a 4) =	35,7888	24,6728	< 0.01
Médias (3 a 5) =	16,0038	11,033	< 0.01
Médias (3 a 6) =	2,8288	1,9501	ns
Médias (3 a 7) =	34,6088	23,8593	< 0.01
Médias (3 a 8) =	13,2613	9,1423	< 0.01
Médias (3 a 9) =	3,3088	2,2811	ns
Médias (3 a 10) =	32,8875	22,6727	< 0.01
Médias (3 a 11) =	8,895	6,1322	< 0.01
Médias (3 a 12) =	10,4063	7,1741	< 0.01
Médias (4 a 5) =	19,785	13,6398	< 0.01
Médias (4 a 6) =	38,6175	26,6229	< 0.01
Médias (4 a 7) =	1,18	0,8135	ns
Médias (4 a 8) =	22,5275	15,5305	< 0.01
Médias (4 a 9) =	39,0975	26,9539	< 0.01
Médias (4 a 10) =	2,9013	2,0001	ns
Médias (4 a 11) =	26,8938	18,5406	< 0.01
Médias (4 a 12) =	46,195	31,8469	< 0.01
Médias (5 a 6) =	18,8325	12,9831	< 0.01
Médias (5 a 7) =	18,605	12,8263	< 0.01
Médias (5 a 8) =	2,7425	1,8907	ns
Médias (5 a 9) =	19,3125	13,3141	< 0.01
Médias (5 a 10) =	16,8838	11,6397	< 0.01
Médias (5 a 11) =	7,1088	4,9008	< 0.05
Médias (5 a 12) =	26,41	18,2071	< 0.01
Médias (6 a 7) =	37,4375	25,8095	< 0.01
Médias (6 a 8) =	16,09	11,0925	< 0.01
Médias (6 a 9) =	0,48	0,3309	ns
Médias (6 a 10) =	35,7163	24,6228	< 0.01
Médias (6 a 11) =	11,7238	8,0824	< 0.01
Médias (6 a 12) =	7,5775	5,2239	< 0.05
Médias (7 a 8) =	21,3475	14,717	< 0.01
Médias (7 a 9) =	37,9175	26,1404	< 0.01
Médias (7 a 10) =	1,7213	1,1866	ns
Médias (7 a 11) =	25,7138	17,7271	< 0.01
Médias (7 a 12) =	45,015	31,0334	< 0.01
Médias (8 a 9) =	16,57	11,4234	< 0.01
Médias (8 a 10) =	19,6263	13,5304	< 0.01
Médias (8 a 11) =	4,3662	3,0101	ns
Médias (8 a 12) =	23,6675	16,3164	< 0.01
Médias (9 a 10) =	36,1963	24,9537	< 0.01
Médias (9 a 11) =	12,2038	8,4133	< 0.01

Médias (9 a 12) =	7,0975	4,893	< 0.05
Médias (10 a 11) =	23,9925	16,5405	< 0.01
Médias (10 a 12) =	43,2938	29,8468	< 0.01
Médias (11 a 12) =	19,3013	13,3063	< 0.01

FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)

VEGF	Resultados	- 2 -
H =	59.2053	
Graus de liberdade =	11	
(p) Kruskal-Wallis =	0	
R 1 (posto médio) =	10.5	
R 2 (posto médio) =	32.7857	
R 3 (posto médio) =	49.5	
R 4 (posto médio) =	10.5	
R 5 (posto médio) =	43.9286	
R 6 (posto médio) =	49.5	
R 7 (posto médio) =	38.3571	
R 8 (posto médio) =	49.5	
R 9 (posto médio) =	49.5	
R 10 (posto médio) =	67.7857	
R 11 (posto médio) =	58.6429	
R 12 (posto médio) =	49.5	
Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	22.2857	0.0874
Grupos (1 e 3) =	39	0.0028
Grupos (1 e 4) =	0	1

Grupos (1 e 5) =	33.4286	0.0104
Grupos (1 e 6) =	39	0.0028
Grupos (1 e 7) =	27.8571	0.0326
Grupos (1 e 8) =	39	0.0028
Grupos (1 e 9) =	39	0.0028
Grupos (1 e 10) =	57.2857	< 0.0001
Grupos (1 e 11) =	48.1429	0.0002
Grupos (1 e 12) =	39	0.0028
Grupos (2 e 3) =	16.7143	0.1999
Grupos (2 e 4) =	22.2857	0.0874
Grupos (2 e 5) =	11.1429	0.3928
Grupos (2 e 6) =	16.7143	0.1999
Grupos (2 e 7) =	5.5714	0.6692
Grupos (2 e 8) =	16.7143	0.1999
Grupos (2 e 9) =	16.7143	0.1999
Grupos (2 e 10) =	35	0.0073
Grupos (2 e 11) =	25.8571	0.0474
Grupos (2 e 12) =	16.7143	0.1999
Grupos (3 e 4) =	39	0.0028
Grupos (3 e 5) =	5.5714	0.6692
Grupos (3 e 6) =	0	1
Grupos (3 e 7) =	11.1429	0.3928
Grupos (3 e 8) =	0	1
Grupos (3 e 9) =	0	1
Grupos (3 e 10) =	18.2857	0.1608
Grupos (3 e 11) =	9.1429	0.4832
Grupos (3 e 12) =	0	1
Grupos (4 e 5) =	33.4286	0.0104
Grupos (4 e 6) =	39	0.0028
Grupos (4 e 7) =	27.8571	0.0326
Grupos (4 e 8) =	39	0.0028
Grupos (4 e 9) =	39	0.0028

Grupos (4 e 10) =	57.2857	< 0.0001
Grupos (4 e 11) =	48.1429	0.0002
Grupos (4 e 12) =	39	0.0028
Grupos (5 e 6) =	5.5714	0.6692
Grupos (5 e 7) =	5.5714	0.6692
Grupos (5 e 8) =	5.5714	0.6692
Grupos (5 e 9) =	5.5714	0.6692
Grupos (5 e 10) =	23.8571	0.0673
Grupos (5 e 11) =	14.7143	0.2591
Grupos (5 e 12) =	5.5714	0.6692
Grupos (6 e 7) =	11.1429	0.3928
Grupos (6 e 8) =	0	1
Grupos (6 e 9) =	0	1
Grupos (6 e 10) =	18.2857	0.1608
Grupos (6 e 11) =	9.1429	0.4832
Grupos (6 e 12) =	0	1
Grupos (7 e 8) =	11.1429	0.3928
Grupos (7 e 9) =	11.1429	0.3928
Grupos (7 e 10) =	29.4286	0.024
Grupos (7 e 11) =	20.2857	0.1197
Grupos (7 e 12) =	11.1429	0.3928
Grupos (8 e 9) =	0	1
Grupos (8 e 10) =	18.2857	0.1608
Grupos (8 e 11) =	9.1429	0.4832
Grupos (8 e 12) =	0	1
Grupos (9 e 10) =	18.2857	0.1608
Grupos (9 e 11) =	9.1429	0.4832
Grupos (9 e 12) =	0	1
Grupos (10 e 11) =	9.1429	0.4832
Grupos (10 e 12) =	18.2857	0.1608
Grupos (11 e 12) =	9.1429	0.4832

FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA 1 (TGFβ1)

TGFβ1	Resultados	- 2 -
H =	57.071	
Graus de liberdade =	11	
(p) Kruskal-Wallis =	0	
R 1 (posto médio) =	15.5	
R 2 (posto médio) =	26.2143	
R 3 (posto médio) =	42.2857	
R 4 (posto médio) =	15.5	
R 5 (posto médio) =	31.5714	
R 6 (posto médio) =	47.6429	
R 7 (posto médio) =	31.5714	
R 8 (posto médio) =	56.8571	
R 9 (posto médio) =	60.7143	
R 10 (posto médio) =	53	
R 11 (posto médio) =	76.1429	
R 12 (posto médio) =	53	
Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	10.7143	0.4112
Grupos (1 e 3) =	26.7857	0.0399
Grupos (1 e 4) =	0	1
Grupos (1 e 5) =	16.0714	0.2177
Grupos (1 e 6) =	32.1429	0.0137
Grupos (1 e 7) =	16.0714	0.2177

Grupos (1 e 8) =	41.3571	0.0015
Grupos (1 e 9) =	45.2143	0.0005
Grupos (1 e 10) =	37.5	0.004
Grupos (1 e 11) =	60.6429	< 0.0001
Grupos (1 e 12) =	37.5	0.004
Grupos (2 e 3) =	16.0714	0.2177
Grupos (2 e 4) =	10.7143	0.4112
Grupos (2 e 5) =	5.3571	0.6812
Grupos (2 e 6) =	21.4286	0.1003
Grupos (2 e 7) =	5.3571	0.6812
Grupos (2 e 8) =	30.6429	0.0188
Grupos (2 e 9) =	34.5	0.0081
Grupos (2 e 10) =	26.7857	0.0399
Grupos (2 e 11) =	49.9286	0.0001
Grupos (2 e 12) =	26.7857	0.0399
Grupos (3 e 4) =	26.7857	0.0399
Grupos (3 e 5) =	10.7143	0.4112
Grupos (3 e 6) =	5.3571	0.6812
Grupos (3 e 7) =	10.7143	0.4112
Grupos (3 e 8) =	14.5714	0.2637
Grupos (3 e 9) =	18.4286	0.1575
Grupos (3 e 10) =	10.7143	0.4112
Grupos (3 e 11) =	33.8571	0.0094
Grupos (3 e 12) =	10.7143	0.4112
Grupos (4 e 5) =	16.0714	0.2177
Grupos (4 e 6) =	32.1429	0.0137
Grupos (4 e 7) =	16.0714	0.2177
Grupos (4 e 8) =	41.3571	0.0015
Grupos (4 e 9) =	45.2143	0.0005
Grupos (4 e 10) =	37.5	0.004
Grupos (4 e 11) =	60.6429	< 0.0001
Grupos (4 e 12) =	37.5	0.004

Grupos (5 e 6) =	16.0714	0.2177
Grupos (5 e 7) =	0	1
Grupos (5 e 8) =	25.2857	0.0525
Grupos (5 e 9) =	29.1429	0.0254
Grupos (5 e 10) =	21.4286	0.1003
Grupos (5 e 11) =	44.5714	0.0006
Grupos (5 e 12) =	21.4286	0.1003
Grupos (6 e 7) =	16.0714	0.2177
Grupos (6 e 8) =	9.2143	0.4798
Grupos (6 e 9) =	13.0714	0.3161
Grupos (6 e 10) =	5.3571	0.6812
Grupos (6 e 11) =	28.5	0.0288
Grupos (6 e 12) =	5.3571	0.6812
Grupos (7 e 8) =	25.2857	0.0525
Grupos (7 e 9) =	29.1429	0.0254
Grupos (7 e 10) =	21.4286	0.1003
Grupos (7 e 11) =	44.5714	0.0006
Grupos (7 e 12) =	21.4286	0.1003
Grupos (8 e 9) =	3.8571	0.7674
Grupos (8 e 10) =	3.8571	0.7674
Grupos (8 e 11) =	19.2857	0.1391
Grupos (8 e 12) =	3.8571	0.7674
Grupos (9 e 10) =	7.7143	0.5541
Grupos (9 e 11) =	15.4286	0.2367
Grupos (9 e 12) =	7.7143	0.5541
Grupos (10 e 11) =	23.1429	0.0759
Grupos (10 e 12) =	0	1
Grupos (11 e 12) =	23.1429	0.0759

Controle medida feridas Pesquisa Ratos X Ozônio			
	IMAGEJ JMC	IMAGEJ JMC	IMAGEJ JMC
	ÁREA INICIAL(mm2)	ÁREA FINAL(mm2)	ÁREA FINAL(mm2)-Incluindo tecido fino
R1.C-7d	76,57	37,991	
R2.C-7d	84,69	22,403	
R3.C-7d	116,42	59,404	
R4.C-7d	95,58	38,19	
R5.C-7d	108,26	20,357	
R6.C-7d	184,75	28,169	
R1.C-14d	109,46	4,97	
R2.C-14d	90,11	7,358	
R3.C-14d	81,63	4,924	
R4.C-14d	98,40	1,45	
R5.C-14d	96,60	1,98	
R6.C-14d	184,75	1,268	
R1.C-21d	87,72	0	1,612
R2.C-21d	120,58	0,084	7,709
R3.C-21d	124,46	0	3,763
R4.C-21d	129,50	0	4,312
R5.C-21d	92,94	0,188	2,092
R6.C-21d	123,19	0	10,189
R1.Oz15-7d	114,88	39,158	
R2.Oz15-7d	121,46	morreu	
R3.Oz15-7d	109,36	59,404	
R4.Oz15-7d	109,60	34,47	
R5.Oz15-7d	107,28	30,703	
R6.Oz15-7d	131,07	26,087	
R1.Oz15-14d	89,24	1,728	
R2.Oz15-14d	78,49	0,844	
R3.Oz15-14d	114,13	0,337	
R4.Oz15-14d	91,89	0,948	
R5.Oz15-14d	135,25	1,359	
R6.Oz15-14d	80,48	0,539	
R1.Oz15-21d	118,39	1,078	5,734
R2.Oz15-21d	96,25	0,923	3,812
R3.Oz15-21d	111,37	0,434	9,761
R4.Oz15-21d	107,53	0,074	4,075
R5.Oz15-21d	111,06	1,065	7,102
R6.Oz15-21d	123,05	2,702	9,135
R1.Oz35-7d	115,67	56,263	
R2.Oz35-7d	129,89	89,016	
R3.Oz35-7d	123,87	59,959	
R4.Oz35-7d	139,98	54,937	
R5.Oz35-7d	144,37	25,414	
R6.Oz35-7d	100,79	28,856	
R1.Oz35-14d	123,76	12,23	
R2.Oz35-14d	110,42	7,218	
R3.Oz35-14d	99,20	4,46	
R4.Oz35-14d	136,66	1,359	
R5.Oz35-14d	89,88	2,033	
R6.Oz35-14d	118,08	0,065	
R1.Oz35-21d	116,09	0	3,065
R2.Oz35-21d	148,72	0,793	7,395
R3.Oz35-21d	130,60	2,181	6,37
R4.Oz35-21d	140,74	0	8,873
R5.Oz35-21d	145,68	1,716	11,007
R6.Oz35-21d	153,62	1,477	6,053
R1.Oz50-7d	131,72	43,73	
R2.Oz50-7d	130,37	41,26	
R3.Oz50-7d	121,35	32,148	
R4.Oz50-7d	167,22	73,13	
R5.Oz50-7d	111,24	32,761	
R6.Oz50-7d	185,12	82,954	
R1.Oz50-14d	115,36	0,7	
R2.Oz50-14d	129,49	4,959	
R3.Oz50-14d	108,61	0,719	
R4.Oz50-14d	122,05	0,868	
R5.Oz50-14d	134,24	6,416	
R6a.Oz50-14d	135,00	1,964	
R6b.Oz50-14d	112,36	1,867	
R1.Oz50-21d	154,48	0,328	17,239
R2.Oz50-21d	141,28	0,657	5,124
R3.Oz50-21d	135,07	2,875	8,6
R4.Oz50-21d	110,05	0,77	1,023
R5.Oz50-21d	111,34	0	5,852
R6.Oz50-21d	106,42	0	8,028

2. Artigo científico 2

REABILITAÇÃO FUNCIONAL E ESTÉTICA EM PACIENTE PORTADORA DE COMUNICAÇÃO BUCONASAL ADQUIRIDA

Janderson de Medeiros Cardoso¹
Erton Massa Miasawa²
Edilson Ervolino³
Leticia Helena Theodoro⁴
Valdir Gouveia Garcia⁵
Luis Eduardo Marques Padovan⁶

¹ Doutorando e Mestre em Implantodontia pela Faculdade ILAPEO

² Doutor e Mestre em Implantodontia pela Faculdade ILAPEO

³ Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp

⁴ Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp

⁵ Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade ILAPEO

⁶ Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade ILAPEO

RESUMO

Pacientes portadores de comunicação buconasal apresentam múltiplos problemas para seu bem estar, dificuldades na alimentação pelo escape de líquidos e sólidos para a cavidade nasal; a dicção pode ser um obstáculo para comunicação pois a fala fica extremamente nasalada. Também podendo influenciar na aparência facial, no sorriso, volume de lábio, a depender da gravidade do caso. Neste caso clínico relatamos uma reabilitação funcional e estética através de implantes osseointegrados e prótese tipo protocolo em conjunto com uma prótese obturadora de palato removível fixada por encaixes de precisão em paciente sequelada com fissura no palato por acidente automobilístico.

Palavras-chave: Comunicação buconasal; prótese obturadora; implantes osseointegrados.

ABSTRACT

Patients with buconasal communication present multiple problems for their well-being, difficulties in eating due to the escape of liquids and solids into the nasal cavity; Diction can be an obstacle to communication as speech is extremely nasal. It can also influence facial appearance, smile, lip volume, depending on the severity of the case. In this clinical case, we report functional and aesthetic rehabilitation using osseointegrated implants and a protocol-type prosthesis in conjunction with a removable palate obturator prosthesis fixed by precision fittings in a patient suffering from a cleft palate resulting from a car accident.

Keywords: Buconasal communication; obturator prosthesis; osseointegrated implants.

INTRODUÇÃO

A fissura labiopalatina é a malformação congênita mais frequente na população humana, ocorre entre a 4 e a 7 semana gestacional. No Brasil ocorre uma média de 1 indivíduo afetado para cada 650 nascimentos (1)

A fissura labiopalatina e a disfunção velofaríngea podem causar distúrbios da comunicação de muitas formas diferentes na articulação, ressonância, voz e linguagem).(2) O manejo de pacientes com FLP (Fissura Lábio Palatina) é um desafio para médicos e dentistas. Além disso, os pacientes com FLP frequentemente apresentam problemas psicológicos além de complicações físicas (3). Crianças com fissura lábio palatais ao nascerem passam por dificuldades devido à má formação congênita, sendo seu primeiro desafio a aceitação dos pais e o convívio entre a sociedade (4).

A deglutição é um ato contínuo onde lábios, língua, arcada dentária, palato, e as bochechas executam movimento sincrônico e necessita de uma integridade tecidual para que não ocorra escapes de alimentos (5). Na fisiologia da deglutição tem a propulsão do bolo alimentar, líquidos ou saliva, da cavidade oral para o estômago (5e6). A fase faríngea da deglutição é uma sequência complexa e integrada de eventos fisiológicos, que propiciam uma adequada passagem do alimento para o esôfago, e evita que o bolo se desvie e vá para a nasofaringe ou tome o caminho da árvore respiratória (7) . Quando não existe um selamento adequado velo faríngeo, permitindo uma comunicação oro e nasofaringe ocorre alterações nas funções de fonação, alimentação e auditiva, podendo na deglutição ocorrer engasgos e refluxos nasais (8 e 9)

A fisiologia da fala é composta por 3 mecanismos sequenciais associados a respiração, laringe (cordas vocais) e as cavidades supraglóticas (fossas nasais e cavidade oral) que tem a função ressonadora (10). Para a produção da fala normal é necessário integridade da vedação velofaríngea que distribui e direciona o fluxo de ar e das vibrações acústicas para a cavidade oral, nos sons orais e para a cavidade nasal nos sons nasais (11). As anormalidades decorrentes de fissuras palatinas refletem em alterações na fala, como a hipernasalidade, distúrbios articulatorios, emissão de ar audível.(12)

CASO CLÍNICO

Paciente Shirley, na história clínica informou que no ano de 2014 teve um acidente automobilístico onde ocorreu uma queda de motocicleta onde estava sendo conduzida pelo irmão, e nesta queda foi lançada com a face diretamente ao meio fio da calçada, onde já no local houveram várias perdas dentárias e fraturas múltiplas da face, foi conduzida pelo Serviço Móvel de Urgência para o Hospital Regional de Paranaguá. A emergência foi atendida por um cirurgião bucomaxilofacial (dr André Miquelussi) e um otorrino que fez a traqueotomia. Após alguns dias de UTI permaneceu internada para melhora do quadro clínico, saiu com uma comunicação buconasal e sem os elementos dentários no primeiro quadrante e com perda significativa da porção alveolar (Fig 5b) , foi transferida para refino do tratamento para hospital da Cruz Vermelha onde foram feitas 6 ou 7 cirurgias para fechamento da comunicação sem sucesso (cortes coronais fig 5c), inclusive com a instalação de 2 implantes no primeiro quadrante que não obtiveram sucesso (fig 4,5). Permaneceu um tempo relativamente longo sem uso de prótese tendo problemas com a dicção e engasgos e afogamentos, quando chegou até nós para uma avaliação (fig 1,2,3), não estava confiante pois já tinha passado por vários profissionais, estava usando uma prótese parcial removível com palato para o fechamento da comunicação, e pelo afundamento do terço médio da face, apresentava um perfil côncavo classe III, mordida cruzada anterior com overjet negativo (fig 1,2). Nestes casos precisamos acolher da melhor forma possível o paciente pois passaram vários anos sem solução para o caso. A proposta foi remover os dentes do segundo quadrante pois já estavam bastante comprometidos, perdas ósseas nos anteriores remanescentes, primeiro pré não respondendo a estímulo, segundo pré condenado por lesão endo pério, e segundo molar com endodontia deficiente e pequena lesão apical, em seguida instalação de implantes, confecção de uma prótese tipo protocolo com encaixes para fixação de uma prótese removível de palato. Proposta aceita pela paciente, o maior problema do caso é a comunicação buco nasal, pois para fazer todo o procedimento

cirúrgico de exodontias, planificação de rebordo ósseo, fresagem para a instalação dos implantes acabaria penetrando líquido pela comunicação, confeccionou-se um pequeno tampão de silicóna de adição para podermos durante todo o procedimento cirúrgico evitarmos algum desconforto para a paciente, iniciamos com bloqueios do nervo infraorbitário bilateralmente, do nervo alveolar superior posterior lado esquerdo, e nasopalatino; quanto as anestésias da região posterior do palato e alveolar posterior do lado direito, optou-se por infiltrativa devido a grande destruição pelo acidente, modificando anatomicamente a região onde faríamos o depósito de anestésico para o bloqueio. Foi usada Lidocaína (Alphacaine 100, DFL) para os bloqueios e complementado com Articaina (Articaíne 100, DFL) para as infiltrativas. Foram feitas todas as extrações, osteotomias necessárias e instalação de cinco implantes Helix GM (Neodent, Curitiba, PR, Brasil) dois no primeiro quadrante (região dos dentes 13 e 14), anteriores a região onde houve perda de estrutura óssea da maxila, e três no segundo quadrante (região dos dentes 22, 24 e 26), preenchimento dos gaps com biomaterial (Cerabone Straumann, Curitiba, PR, Brasil) hidratado com iPRF, suturado com fechamento primário dos tecidos e aplicação de laser de baixa potência no pós imediato, 3J por vestibular e 3J por palatino na região de cada implante, e 3 J na região de cada elemento removido. Optou-se pela técnica de dois estágios cirúrgicos com os implantes sepultados para aguardar a cicatrização dos alvéolos e remodelação óssea. Medicada com Amoxicilina 875mg durante 7 dias, e dipirona 500mg por 3 dias. Após um período de 4 meses, foi realizada a reabertura sob anestesia infiltrativa com Articaina (Articaíne 100, DFL), foram instalados intermediários protéticos (mini pilares Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil) (fig 6,7,8), feito escaneamento destes com Transfer de escaneamento de mini pilar (Neodent, Curitiba, PR, Brasil) para planejamento digital, mais moldagem convencional para a confecção das próteses, optou-se por usar a Técnica do Assentamento Passivo Neodent para maior precisão na adaptação da barra aos mini pilares. Para a prótese obturadora removível do palato foi optado por usar um encaixe de precisão com

trava mecânica modelo SR 3.0 da empresa CNG (São Paulo, SP, Brasil) (fig 7 A e B). A remoção da parte móvel se faz com uso de um instrumento que se adapta a dois pequenos orifícios próximos ao componente SR 3.0.). A paciente foi treinada para colocação e remoção adequada da prótese de palato e foi orientada sobre procedimentos de higiene bucal e manutenção correta da prótese.

Caso concluído com alto índice de satisfação e confiança da paciente. (fig 15,16,17,18), Podemos observar as mudanças nas expressões comparando as figuras 19,20 e 21,22, percebemos nitidamente a harmonização alcançada da face com a conclusão do plano inicial de tratamento.



Figura 1 – A. Perfil pré-tratamento sorrindo; B. Perfil pré-tratamento em repouso; C. Face pré-tratamento

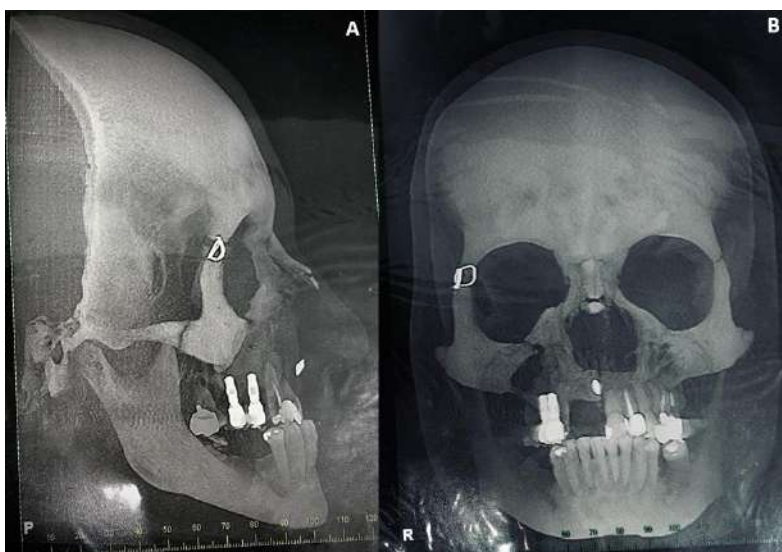


Figura 2 – A. Telerradiografia de perfil pré-tratamento; B. Radiografia PA pré-tratamento

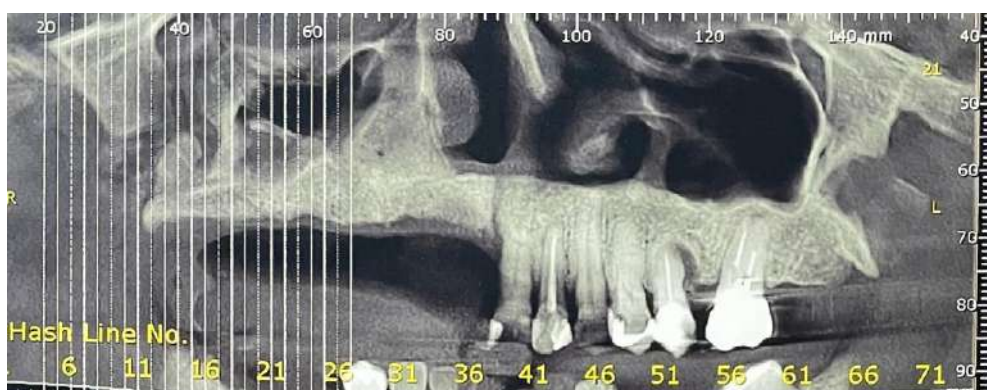


Figura 3 – Reconstrução panorâmica de tomografia pré-tratamento

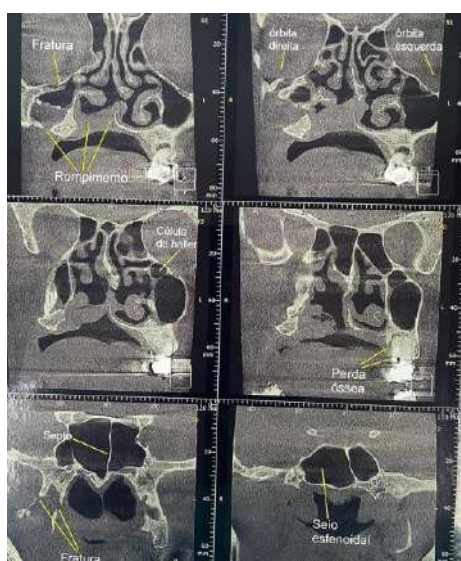


Figura 4 – Cortes coronais tomográficos pré-tratamento

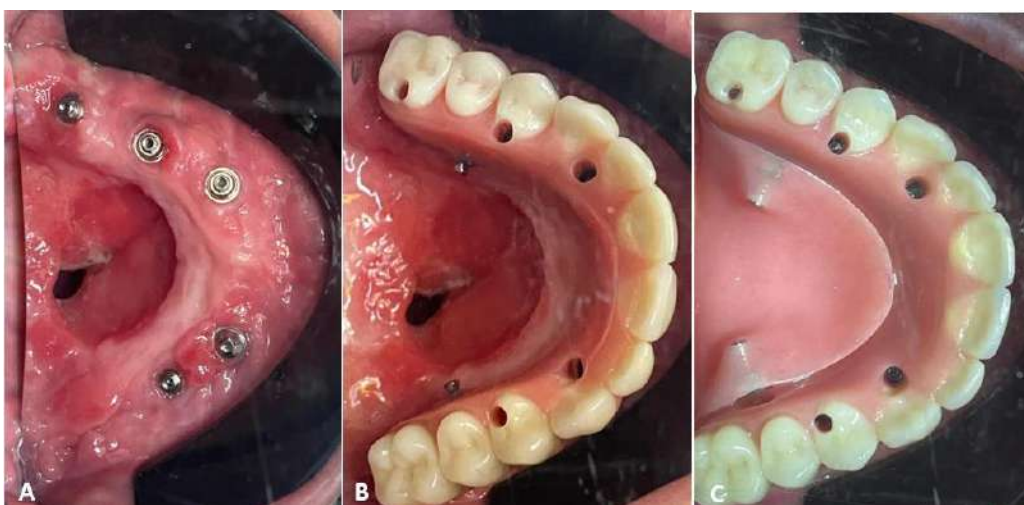


Figura 5 – A. Mini pilares instalados; B. Protocolo instalada; C. Protocolo com prótese de palato obliterador instalado



Figura 6 – A. Visão frontal da protocolo e palato obliterador removível; B. Visão oclusal da prótese protocolo e dos encaixes SR 3.0; C. Visão do palato removível adaptado aos encaixes

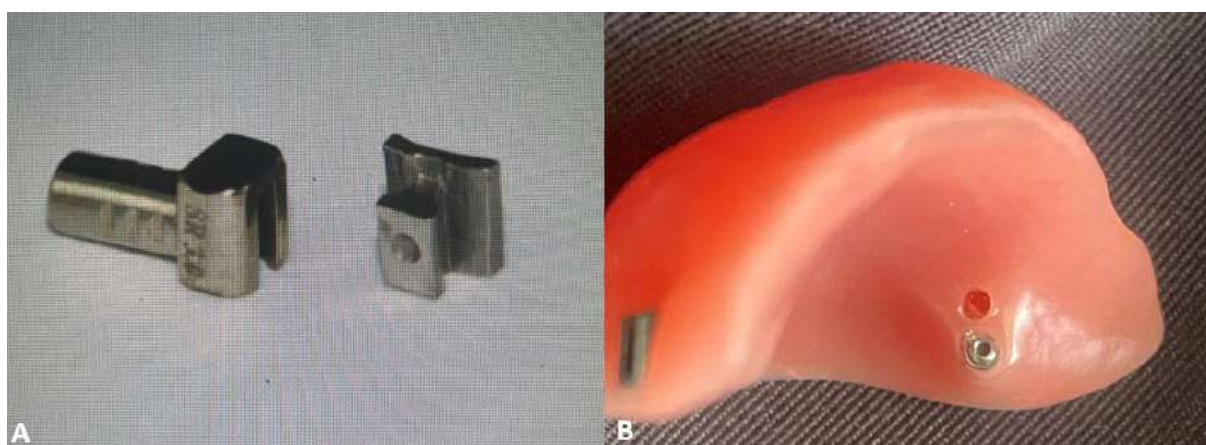


Figura 7 – A. encaixe de precisão com trava mecânica modelo SR 3.0 da empresa CNG; B. Fêmea do encaixe instalado no palato obliterador mais visão do orifício usado para remoção da peça obliteradora.



Figura 8 – A. Face em repouso pós cirurgia e instalação de protocolo; B. Face com sorriso pós cirurgia e instalação de protocolo; C. Perfil em repouso pós cirurgia e instalação de protocolo; D. Perfil sorrindo pós cirurgia e instalação de protocolo

DISCUSSÃO

Múltiplas possibilidades para o tratamento poderiam ser propostas, principalmente fechamento cirúrgico da comunicação, mas além dessa correção seria necessário procedimentos para corrigir o afundamento do terço médio da face, podendo ser dificultado pois existiam várias fraturas não consolidadas mesmo após 8 anos terem se passado do acidente.

Em casos cuidadosamente selecionados, os implantes dentários podem melhorar a retenção, estabilidade e função oclusal das próteses (13). A fístula palatina é uma complicação comum do reparo cirúrgico da fissura palatina observada em diferentes estudos e para corrigir sequelas inevitáveis da cirurgia, a reabilitação protética com obturador é um tratamento auxiliar ou complementar aos tratamentos cirúrgicos; um obturador removível fixo proporciona confiança e conforto psicossocial e com a ponte de Andrew conseguimos restaurar os tecidos de suporte que faltavam com os dentes. (14)

Isso promove a cura física e psicológica do paciente e melhora a estética. Assim, o acúmulo de efeito positivo com confiança e conforto psicológico como resultado do uso da ponte Andrews para uma fístula oronasal melhorou, sem dúvida, a qualidade de vida do paciente.(14)

A fabricação de barras suportadas por implantes para retenção e suporte da sobredentadura resulta em distribuição igual de cargas oclusais entre os implantes. Contudo, a fixação da barra aumenta a área de superfície para acúmulo de placa, bem como o custo do paciente, e prolonga o curso do tratamento.(15)

Vários acessórios de precisão nos proporcionaram a oportunidade de tornar a prótese fixa do tipo removível; dando uma dupla vantagem ao paciente, ou seja, conforto através do tipo fixo e fácil manutenção através do tipo removível.(16)

CONCLUSÃO

No caso clínico descrito, devido a complicações em cirurgias anteriores onde não obtiveram sucesso nas tentativas de fazer o fechamento da comunicação buco nasal, a paciente apresentava com um quadro de depressão e desânimo com os resultados obtidos até então, não queria ser submetida a novas tentativas de fechamento cirúrgico da comunicação, mas gostaria de que melhorasse a sua condição tanto de função como estética, pois apresentava dificuldades na mastigação e a prótese parcial removível que usava não a agradava esteticamente e não possuía estabilidade satisfatória, causando escapes de ar e de líquidos que penetravam na cavidade nasal. Com a confecção da prótese protocolo implantossuportada e a prótese obliteradora removível de palato, foram solucionadas as expectativas, agora ela está extremamente satisfeita quanto a sua condição estética e funcional.

REFERÊNCIAS

1. Nagem Filho H, Moraes N, Rocha RGF. Contribuição para o estudo da prevalência das máis formações congênitas lábio-palatais na população escolar de Bauru. Rev Fac Odontol. 1968; 6:111-28.
2. De Bodt M, Van Lierde K. Cleft palate speech and velopharyngeal dysfunction: the approach of the speech therapist. B-ENT. 2006;2(Suppl4):63-70
3. Acharya V, Brecht LE. Conventional prosthodontic management of partial edentulism with a resilient attachment-retained overdenture in a patient with a cleft lip and palate. The Journal of prosthetic dentistry, 2014 – Elsevier
4. Lisbôa PK, Rocha VP, Pini R. Fissura Labio Palatal: Uma Revisão de Literatura.
5. Marchezan, IQ. Deglutição - Normalidade. Em: Furkin, AM e Santini, CS (eds). Disfagias Orofaríngeas. Carapicuíba, Pró-Fono; 1999, pp. 3-18.
6. Reid J, Reilly S, Kilpatrick N. Sucking performance of babies with cleft conditions. Cleft Palate Craniofac J. 2006, 44(3):312-320.
7. Silva DP, Dornelles S, Paniagua LM, Costa SS, Collaree MV. Aspectos Patofisiológicos do Esfíncter Velofaríngeo nas Fissuras Palatinas. Arq. Int. Otorrinolaringol, São Paulo. 2008. V.12, n.3, p. 426-435.

8. Tabith Jr A. Contribuição ao estudo da insuficiência velofaríngea. São Paulo, 1989 (Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo).
9. Mc Connel FN. Analysis of pressure generation and bolus transit during pharyngeal swallowing. *Laryngoscope*. 1988, 98(1):71-8.
10. Altmann EBC, Vaz ACN, De Farias Ramos ALN, De Paula MBSF, Khoury RBF, Marques RMF. Tratamento Fonoaudiológico. Em: Altmann, EBC. Fissuras Labiopalatinas. 4a. Ed. Barueri: Pró-fono; 2005, pp. 367-403.
11. Camargo LOS, Rodrigues CM, Avelar JA. Oclusão velofaríngea em indivíduos submetidos à nasoendoscopia na clínica de educação para saúde (CEPS). *Salusvita Bauru*. 2001, 20(1):35-48.
12. Whitehill TL, Chau CHF. Singleword intelligibility in speakers with repaired cleft palate. *Clinical Linguistics & Phonetics*. 2004;18(4-5):341-355.
13. Hakan Tuna S, Pekkan G, Buyukgural B. Reabilitação de um paciente edêntulo com fissura de lábio e palato com defeito de palato mole usando uma prótese de fala suportada por implante e retida por barra: um relato clínico. *Fissura Palatina Craniofac J*. 2009;46(1):97-102
14. PV Harish, Nandakishore Bhojaraju, GR Sowmya, Makam Gangaiah. *J. Indian Prostodont Soc*. 2012; 14(3):317-320.
15. Flanagan D. An Implant-Retained Maxillary Overdenture to Obturate a Patent Oronasal Communication: A Case Report. *J Oral Implantol*. 2009;35(1):12-17.
16. Harish, P. V., Bhojaraju, N., Sowmya, G. R., & Gangaiah, M. Management of Oro-Nasal Fistula Using Andrew's Bridge: A Case Report. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*. 2012; 14(3), 317–320.