

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO ÓLEO OZONIZADO NA REPARAÇÃO DE**  
**RETALHO CUTÂNEO EM RATOS**

**Aline Medeiros Nakamura**  
**Médica Veterinária**

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO ÓLEO OZONIZADO NA REPARAÇÃO DE  
RETALHO CUTÂNEO EM RATOS**

**Discente: Aline Medeiros Nakamura**

**Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**

**Coorientadora: Dra. Josiane Moraes Pazzini**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Cirurgia Veterinária**

N163e	<p>Nakamura, Aline Medeiros</p> <p>Efeito do óleo ozonizado na reparação do retalho cutâneo em ratos / Aline Medeiros Nakamura. -- Jaboticabal, 2020 49 f.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Andriago Barboza de Nardi Coorientadora: Josiane Moraes Pazzini</p> <p>1. Ozone. 2. Oxigênio. 3. Retalhos cirúrgicos. 4. Ratos wistar. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Aline Medeiros Nakamura, nascida em Franca, estado de São Paulo no dia 19 de abril de 1985. Licenciada em Educação Física pela Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP em 2008. Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, colando grau no dia 30 de janeiro de 2015. Residente em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais no Programa de Residência em Área Profissional da Saúde pela Universidade Federal de Uberlândia durante os anos de 2016 a 2017. Ingressante no Programa de Pós-Graduação pela Unesp, Câmpus Jaboticabal no ano de 2018, sendo mestranda pelo Programa de Cirurgia Veterinária sobre a orientação do Professor Doutor Andriago Barboza de Nardi e coorientação da Doutora Josiane Moraes Pazzini.

**Epígrafe**

“Nossa mente serve para ter ideias, não para armazená-las”

David Allen

## **Dedicatória**

À minha mãe, Leonizia e irmãos, Fernanda, Fábio e Gilberto. Sem minha família nada disso seria possível.

Ao meu companheiro Daniel por estar ao meu lado em cada batalha, acreditando até mais do que eu mesma.

Também dedico este trabalho a todo paciente que pude tratar, aprender e ajudar.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família por me ensinar o valor do conhecimento, pelo apoio e amor incondicional.

Ao Daniel Alves pela compreensão e carinho durante toda essa caminhada.

Ao meu orientador professor Andriago Barboza De Nardi que, confiou neste trabalho e sempre ofereceu inúmeras oportunidades de aperfeiçoamento profissional. Admiro o fato de ser tão querido por inúmeros colegas veterinários desse país e no exterior, sem dúvida uma pessoa ímpar. Obrigada por tudo.

À Dra. Josiane Pazzini, minha co-orientadora, obrigada por ler e responder minhas mensagens, por me manter estimulada e focada no trabalho, agradeço imensamente a parceria, didática e paciência.

Aos professores da FCAV-UNESP Jaboticabal e todos os outros professores que passaram por minha jornada de estudos. Sou grata e respeito cada um deles.

Para a realização desse projeto e para a vida foi imprescindível o apoio de amigos que considero também excelentes profissionais, pesquisadores e principalmente incentivadores, acredito que com amigos tudo é possível, obrigada Marcelo Carrijo, Jorge Gómes, Celso Brandi, Ariadne Rein, Gabriel Carra, Prof. André Faro e Stella Habib. Gostaria de nomear muito mais nomes que tenho carinho, aqui neste parágrafo.

Quero agradecer também a todos os pós-graduandos do Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) que me ajudaram a trilhar o caminho da oncologia veterinária.

À minhas amigas Laryssa Rosseto e Aline Kawanami, companheiras do Serviço de Reabilitação Veterinária do Hospital Veterinário. Nesse setor que visualizei a possibilidade de integrar a acupuntura em pacientes oncológicos e proporcionar melhor qualidade de vida a eles e a seus tutores. E a professora Paola Castro Moraes por apoiar esse serviço que prestigo tanto.

Ao Hospital Veterinário, funcionários, pós-graduandos e residentes por toda ajuda e companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 1804984.



## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....</b>	<b>1</b>
1 Introdução.....	1
2 Revisão de literatura .....	2
2.1 Estruturas e vascularização da pele .....	2
2.2 Retalhos cutâneos .....	3
2.3 Cicatrização e fatores contribuintes para necrose do retalho cutâneo .....	4
2.4 Modelo experimental em ratos do retalho cutâneo dorsal de McFarlene...5	
2.5 Ozônio e ozonioterapia .....	6
2.5.1 História e composição .....	6
2.5.2 Ozônio terapêutico e mecanismo de ação .....	7
2.5.3 Óleo ozonizado.....	8
2.5.3.1 Estrutura química do óleo ozonizado .....	8
2.5.3.2 Óleo ozonizado e cicatrização.....	8
3. Referência.....	9
<b>CAPÍTULO 2 – Avaliação da reparação do retalho cutâneo dorsal de padrão axial em ratos tratados com óleo ozonizado .....</b>	<b>13</b>
RESUMO.....	13
1 Introdução.....	14
2 Material e Método .....	15
2.1 Seleção dos pacientes .....	15
2.2 Protocolo anestésico e procedimento cirúrgico.....	15
2.3 Eutanásia e coleta de material.....	17
2.4 Avaliação macroscópica .....	18
2.5 Avaliação microscópica .....	18
3 Análise estatística .....	19
4 Resultados .....	20

<b>4.1 Avaliação macroscópica .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Planimetria digital .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3 Avaliação microscópica .....</b>	<b>22</b>
<b>5 Discussão .....</b>	<b>25</b>
<b>6 Conclusão .....</b>	<b>28</b>
<b>7 Referências .....</b>	<b>28</b>
<b>APENDICE A – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA .....</b>	<b>31</b>
<b>APÊNDICE B – INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS MICROSCÓPICAS.....</b>	<b>32</b>

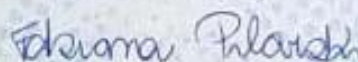
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Retalho cutâneo dorsal associado com óleo ozonizado favorecendo a cicatrização em ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*)**", protocolo nº 011163/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 10 de outubro de 2018.

Vigência do Projeto	05/11/2018 a 05/11/2019
Espécie / Linhagem	<i>Rattus norvegicus albinus Wistar</i>
Nº de animais	16
Peso / Idade	30 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Campus de Botucatu.

Jaboticabal, 10 de outubro de 2018.

**Profª Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

## **EFEITO DO ÓLEO OZONIZADO NA REPARAÇÃO DE RETALHO CUTÂNEO EM RATOS**

**RESUMO** – A necrose é complicação frequente em cirurgias reconstrutivas, sendo assim, terapias adjuvantes são utilizadas com intuito de minimizar essas complicações. A ozonioterapia é utilizada para intervir no processo de reparo de feridas, inclusive as pouco vascularizadas como úlceras de pé diabético. Tem potencial antimicrobiano, antioxidante e ativa a proliferação de fibroblastos, todavia pouco se sabe sobre o comportamento em cirurgias reconstrutivas. A proposição dessa pesquisa foi avaliar o efeito do óleo ozonizado tópico na viabilidade do retalho cutâneo em ratos. Foi realizado estudo com 18 ratos da linhagem Wistar, distribuídos em 2 grupos com 9 animais cada, correspondentes aos grupos óleo de girassol (GG) e óleo de girassol ozonizado (GO). Os retalhos cutâneos foram delimitados no dorso de cada animal, medindo 10x3 cm com limites anatômicos: ângulo inferior das escápulas, as cristas ilíacas, centralizado sobre a coluna vertebral, cuja base do retalho é o limite cranial. Foi aplicado 1mL de óleo de girassol ou 1 mL óleo de girassol ozonizado, nos respectivos grupos GG e GO, antes da síntese do retalho no leito receptor e após, por via tópica na dose de 1 mL, sendo reaplicado a cada 12 horas, por 7 dias consecutivos. As variáveis macroscópicas como edema, exudato, necrose, coloração e aspecto cosmético foram analisadas no 3º, 7º e 14º dia pós-operatório. No dia 14 foi realizado planimetria digital para avaliação da área total do retalho, área necrosada e porcentagem de necrose dos retalhos. A avaliação histológica foi realizada mediante biopsia de pele para avaliar os processos de reparo e angiogênese do retalho. A planimetria digital revelou que não houve diferença estatística da viabilidade do retalho entre os grupos, contudo a média da área total do retalho cutâneo foi maior em GO. A variável macroscópica aspecto cosmético foi melhor em GO. Na avaliação histológica o grupo óleo de girassol ozonizado apresentou maior número de vasos em relação ao grupo óleo de girassol, houve maior expressão do colágeno tipo I nos dois grupos, mas não houve diferença estatística entre grupos. Conclui-se que a utilização do óleo de girassol ozonizado não alterou a viabilidade do retalho cutâneo, porém induziu menor contração cutânea e maior neovascularização.

**Palavras-chave:** cirurgia reconstrutiva, ozonioterapia, colágeno, ferida, ratos Wistar

## EFFECT OF OZONIZED OIL ON SKIN FLAP REPAIR IN RATS

**ABSTRACT-** Necrosis are frequent complications in reconstructive surgery. Adjuvant therapies are used to minimize them. Ozone therapy is used to intervene in the wound repair process, including those with reduced vascularization such as ulcers diabetic foot. It has antimicrobial, antioxidant potential, and activates the proliferation of fibroblasts. However much remains unknown about its behavior in reconstructive surgery. The purpose of this research is to evaluate the effect of topical ozonated oil on the viability of the skin flap in rats. The study was carried out with 18 rats of the Wistar lineage, distributed in 2 groups with 9 animals each, corresponding to the sunflower oil group (GG) and ozonized sunflower oil group (GO). The retalhos cutâneos were delimited on the back of each animal, measuring 10x3 cm with anatomical limits: lower angle of the scapulae, the iliac crests centered on the spine, whose base of the flap is the cranial limit. Sunflower oil (1ml) or ozonated sunflower oil (1ml) was applied in the respective GG and GO groups, before the flap synthesis in the receiving place, and after, being reapplied every 12 hours for 7 consecutive days, topically (1 ml). Macroscopic variables such as edema, exudate, necrosis, color, and cosmetic appearance were analyzed on the 3rd, 7th and 14th postoperative days. On day 14, digital planimetry was performed to assess the total skin flap area, necrotic area and percentage of flap necrosis. Histological evaluation was performed by skin biopsy to assess the repair and angiogenesis processes of the flap. The digital planimetry revealed that there was no statistical difference in the viability of the skin flap between the groups. However, the average of the total area of the largest skin flap was greater in GO. The macroscopic variable cosmetic aspect was better in GO. In the histological evaluation, the ozonized sunflower oil group had a higher number of vessels than the sunflower oil group. Larger expressions of type I collagen were observed in both groups but without any statistical difference between them. It follows that the use of ozonated sunflower oil does not alter the viability of the skin flap, however it induces less skin contraction and greater neovascularization.

**Keywords:** reconstructive surgery, ozonotherapy, collagen, Wistar rats

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAT- Catalase

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutadiona peroxidase

GST – Glutadiona S-transferase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de oxigênio

LOPs – Peróxido lipídico

mL – Mililitro

SOD – Superóxido desmutase

VEGF – fator dcrescimento endotelial

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Evolução qualitativa macroscópica de coloração, necrose, exudato e edema e aspecto cosmético em três diferentes momentos, 3°, 7° e 14° dia pós-operatório em retalhos cutâneos dorsais de ratos Wistar tratados com óleo de girassol (GG) e óleo de girassol ozonizado (GO). FCAV/UNESP, 2019.....20
- Tabela-2.** Porcentagem de necrose de retalhos cutâneos dorsais de ratos Wistar submetidos ao procedimento cirúrgico na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.....22
- Tabela-3.** Valores médios da área total de retalhos cutâneos dorsais dos grupos submetidos ao procedimento cirúrgico na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.....22

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem fotográfica do procedimento cirúrgico do retalho cutâneo dorsal em rato Wistar. Marcação de retalho cutâneo dorsal em rato Wistar com caneta dermográfica Texta 700®. (A) A base do retalho cranialmente foi delimitada pelo ângulo inferior da escápula (seta preta) e caudalmente pela crista íliaca (seta amarela). Em (B) a demarcação dos limites do retalho cutâneo dorsal segundo modelo de McFarlene modificado com dimensões de 10 cm de comprimento por 3 cm de largura. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.....16
- Figura 2.** Imagem fotográfica do procedimento cirúrgico visando a confecção de retalho cutâneo dorsal em rato Wistar. Em (A) incisão do retalho com base cranial com auxílio de bisturi. Em (B) elevação do retalho após incisão da pele, divulsão do tecido subcutâneo e panículo carnosos. Em (C) dermorráfia com nylon 3-0 em pontos simples separado após reposicionamento do retalho no leito receptor. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.....17
- Figura 3.** Imagem fotográfica do retalho cutâneo demonstrando esquematicamente a distribuição da aplicação do óleo sobre o retalho e ao redor da ferida cirúrgica com auxílio de uma seringa de 1 ml e contenção do animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.....17
- Figura 4.** Fotografias comparativas dos retalhos cutâneos dorsais em ratos no GG e GO nos três momentos de avaliação. – Aparência do retalho cutâneo no 3º dia (A e D), 7º dia (B e E) e 14º dia (C e F) de pós-operatório. Notar área hemorrágica da porção distal do retalho (círculos). Notar a demarcação da área de necrose e área viável (seta amarela). Observar área pálida bem demarcada por uma linha horizontal (seta branca). Notar a diferença de



retração cicatricial do GG (retângulo amarelo) e GO (retângulo branco).  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.....21

**Figura 5.** Fotomicrografia da derme de rato submetido ao procedimento de retalho de padrão axial no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, 2019. (A) Vaso sanguíneo identificado (seta) em GG. (B) Presença de maior neovascularização na área circunscrita e identificação de vasos (seta) no GO. HE em aumento de 400x.....23

**Figura 6.** Fotomicrografia de derme e epiderme em ratos submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Campus Jaboticabal, 2019. Notar a intensidade da re-epitelização (seta).....23

**Figura 7.** Fotomicrografia com microscópio de luz polarizada analisada Olympus BX-53 das áreas de transição dos retalhos cutâneos dorsais em ratos da linhagem Wistar após 15 dias de pós-operatório do procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Campus Jaboticabal, 2019. (A) fotomicrografia empregando software Image J delimitam em amarelo o local de captura das imagens para quantificação de colágeno tipo III (fibras em verde). (B) fotomicrografia analisada pelo software Image J delimitam em amarelo o local de captura das imagens para quantificação de colágeno tipo I (fibras em vermelho).....24

**Figura 8.** Representação gráfica em colunas da porcentagem média de expressão de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) para o GG e GO – Observar predominância de colágeno vermelho em ambos os grupos. Entre grupos não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.....25

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **1 Introdução**

Reparos de grandes feridas que não podem ser reaproximadas de forma primária ou que ficariam para cicatrizar por segunda intenção têm se beneficiado das técnicas de cirurgia reconstrutora, o que garante sua cobertura imediata, diminui o tempo de cicatrização e retorno precoce à atividade funcional (Castro et al., 2015). O domínio das técnicas de reconstrução permite grande avanço na sobrevivência dos pacientes com câncer, pois possibilita o planejamento de amplas margens cirúrgicas, com manutenção da função e aparência cosmética (Daleck e De Nardi, 2016).

Os retalhos cutâneos são umas das técnicas empregadas nas cirurgias reparadoras e consistem em uma porção de tecido retirado parcialmente de seu local de origem, mantendo a vascularização original apenas por sua base (pedículo) e transferido do leito doador para um local adjacente com o intuito de recobrir a ferida (Daleck e De Nardi, 2016).

O trauma cirúrgico realizado durante a confecção do retalho e dimensões superiores a capacidade do pedículo em nutrir as extremidades mais distais do retalho comprometem a microcirculação e inicia-se um processo de isquemia e necrose local. Para evitar ou pelo menos minimizar as complicações pós-cirúrgicas deve-se seguir alguns princípios preconizados para as técnicas cirúrgicas reparadoras como manipulação delicada, avaliação da elasticidade e linhas de tensão da pele para a espécie, disponibilidade da área doadora e qualidade do leito receptor (Amsellem, 2011).

Para a melhora dos resultados em cirurgia reparadora, alguns autores também têm sugerido o uso de curativos compressivos e drenos com intuito de minimizar a formação de seroma para diminuir a mobilidade do retalho e uso de substâncias que auxiliem no reparo tecidual, essas indicações objetivam estimular a angiogênese, acelerar o processo de reparo tecidual e proporcionar melhor aspecto cosmético (Pavletic, 2018).

A ozônioterapia é uma modalidade de tratamento utilizada em uma série de condições clínicas e pesquisas mais recentes apontam para seus efeitos microbicida, analgésico, anti-inflamatório, imunomodulador e principalmente no reparo de feridas (Smith et al., 2017; Zeng e Lu, 2018).

O ozônio é uma molécula triatômica de oxigênio altamente instável, um potente oxidante que intervém no equilíbrio de óxido-redução do organismo. Quando em contato com tecidos orgânicos assume a forma reativa do oxigênio e influencia em eventos bioquímicos e moleculares do metabolismo celular proporcionando os benefícios clínicos descritos (Bocci, et al., 2009). Pode ser utilizado em diversas apresentações como gás puro, diluído em veículo aquoso, em óleo ou no sangue (León et al., 1998).

Dessa forma, delineou-se este estudo a fim de avaliar o óleo ozonizado na reparação tecidual do retalho cutâneo dorsal em ratos, mediante avaliação da epitelização e angiogênese.

## **2 Revisão de literatura**

### **2.1 Estruturas e vascularização da pele**

A pele é constituída de duas camadas: epiderme e derme. A epiderme é uma camada fina, avascular, compostas por queratinócitos, é a barreira primária contra a entrada de patógenos e desidratação. A derme é a camada que dá suporte à epiderme constituída por tecido conjuntivo (fibras colágenas, reticulares e elásticas e matriz extracelular composta de ácido hialurônico e ácido condroitino sulfúrico), capilares sanguíneos, linfáticos, nervos e as estruturas anexas (folículo piloso, estruturas glandulares e músculo eretor do pelo) (Campbell e Lichtensteiger, 2004).

O tecido subcutâneo está localizado sob à pele e conecta a pele ao músculo cutâneo, tem relação direta com a elasticidade da pele e está associado ao plexo subdérmico em que vasos cutâneos direto atravessam o subcutâneo para suprir a pele adjacente (Pavletic, 2018).

Importante salientar que 90% das fibras dérmicas são compostas de colágeno e sua disposição tridimensional na matriz tem correlação direta com suas

propriedades viscoelásticas e a matriz extracelular compreende uma variedade de componentes proteicos (fibronectina, metaloproteinases, inibidores de metaloproteinases) ativos durante a cicatrização das feridas (Pavletic, 2018)

Quanto a vascularização da pele, está se origina das grandes artérias e veias que penetram os grandes músculos para após penetrar o panículo cutâneo de forma paralela e nutrir a derme pela enosculação perpendicular. Baseado na irrigação e nas estruturas da pele este tecido é dividido e classificado em três seguimentos: plexo profundo ou subdérmico, plexo médio ou cutâneo e plexo superficial ou subpapilar (Pavletic, 2018; Campbell e Lichtensteiger, 2004).

Um cuidado necessário no ato cirúrgico é garantir a integridade da vascularização para fornecer o suprimento necessário para sua sobrevivência (Wardlaw, 2012). Quando ocorre o comprometimento da irrigação do retalho, a necrose na porção distal ou de toda a pele pode ocorrer (Mankin, 2017).

## **2.2 Retalhos cutâneos**

Os retalhos cutâneos são segmentos de pele parcialmente removidas de seu leito original mantendo apenas conexão com sua base para ser transferida para o leito receptor próximo ao local de origem, permitindo o recobrimento de feridas (Pavletic, 2018).

Em medicina veterinária, os retalhos cutâneos são classificados de acordo com o tipo de circulação e localização anatômica, podem ser retalho de padrão subdérmico (RPS) ou retalho de padrão axial (RPA) (Scheffer et al., 2013).

Os RPS caracterizam-se pela vascularização do plexo subdérmico que estão distribuídos nas três camadas (epiderme, derme e panículo cutâneo) que constituem o retalho (Huppés, et al., 2015). Os RPS mais utilizados em medicina veterinária são os retalhos de avanço, rotação, transposição ou de prega inguinal e axilar (Huppés, et al., 2015; Pavletic, 2018).

Os RPA são retalhos que incorporam uma artéria e uma veia cutânea direta em sua base (angiossoma), por conta da origem da vascularização direta uma grande área de pele pode compor esse retalho para recobrir a ferida (Mankin, 2017). Seu nome é dado de acordo com o vaso que nutre a região anatômica, temos por exemplo,

o retalho da epigástrica superficial caudal, da genicular, da toracodorsal, da auricular caudal, entre outros (Mankin, 2017).

### **2.3 Cicatrização e fatores contribuintes para necrose do retalho cutâneo**

Os retalhos cutâneos são frequentemente utilizados para o recobrimento de feridas extensas, contudo a necrose é uma das complicações mais frequentes neste tipo de técnica cirúrgica reparadora. Mesmo estabelecendo os princípios de preservação da vascularização é comum a necrose distal de 20 a 33% em retalhos de padrão axial (Harder et al., 2008). Três fatores já foram discutidos por estudos anteriores que estão correlacionados com a necrose do retalho, entre eles o fluxo sanguíneo inadequado e o estresse oxidativo iniciado pela injúria tecidual (Zhou et al., 2016).

Referente ao fluxo sanguíneo, este é ocasionado pela falha da perfusão, existe uma relação direta entre as dimensões do retalho e a menor capacidade do angiossoma em nutrir extremidades mais distais (Pavletic, 2018). Outros fatores que contribuem para diminuir o fluxo sanguíneo referem-se a qualquer obstrução total ou parcial do angiossoma, como manipulação traumática durante o procedimento cirúrgico, seja por excesso de tensão ou rotação do retalho durante a manipulação (Mankin, 2017).

O momento da elevação do retalho compromete a perfusão tecidual temporariamente, por lesão da circulação microvascular existente, o que provoca a isquemia temporária. O tecido ao ser reperfundido eleva-se a teores críticos o oxigênio favorecendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidos como radicais livres que provoca injúrias às membranas celulares e consequente morte das células. Os radicais livres são neutralizados pelos agentes pró oxidantes endógenos, quando há um desequilíbrio entre essa defesa antioxidante ocorre o que denominamos de estresse oxidativo resultante em dano tecidual (Picanço et al. 2012).

Em 1988, Basford e Furtrell ao estudarem enzimas que fazem parte do metabolismo dos radicais livres em retalho cutâneo dorsal de ratos, observaram que a concentração era maior nas porções distais do retalho, evidenciando produção

indireta de radicais livres nessa região quando comparada a outras porções do retalho, associando seus efeitos deletérios ao tecido na porção menos vascularizada.

#### **2.4 Modelo experimental em ratos do retalho cutâneo dorsal de McFarlene**

O retalho cutâneo dorsal em ratos é modelo preferencialmente escolhido para estudos experimentais da viabilidade de retalhos cutâneos de padrão axial. McFarlene et al. (1965) foram os primeiros a descreverem o modelo para avaliação de necrose em retalhos cutâneos. Estes autores padronizaram as dimensões de 10 cm de comprimento para 4 cm de largura com a base do retalho cutâneo no limite cranial do retângulo entre as escápulas, e foi observado em 94,3 % dos animais avaliados que o procedimento foi considerado viável, com necrose de 25% não mais que 50% do retalho.

Com isso estabeleceram que um dos critérios para o sucesso dos retalhos é a relação direta entre seu comprimento e a porcentagem de necrose, definiram a proporção de até 2,5:1, de comprimento e largura, respectivamente, do retalho para que ocorra menor quantidade de necrose na porção distal do retalho cutâneo.

Entretanto, muitos estudos, apesar de citarem a técnica, empregam tamanhos e padronização diferentes para a base do pedículo, podendo ser cranial ou caudal. Isto modifica a consistência dos resultados, pois são descritas áreas de necrose que varia de 10 a 60% (Camargo et al., 2014).

O modelo de McFarlene et al. (1965) foi adaptado por Camargo et al. (2014) pela justificativa de o modelo anterior não apresentar consistência entre os resultados e nem necrose significativa para o estudo de estratégias que possam modificar a viabilidade do retalho, necessitando de adaptação para padronização. Assim sendo, foi sugerido por estes autores, um retalho de 10 cm de comprimento por 3 cm de largura com a base do pedículo também cranial, neste estudo foi comparado o modelo tradicional de McFarlene e o modelo adaptado proposto, concluindo que o retalho com essas dimensões é mais apropriado para estudos experimentais de viabilidade de retalhos cutâneos.

Da mesma forma, foi avaliado por outro grupo de pesquisadores a comparação do modelo adaptado, porém comparando diferentes base do pedículo, um grupo com

a base na porção cranial do dorso e o outro com base na região caudal, resultando em taxas de necrose de 54.4 % (13,9-81,20) e 32,72% (18,78-47,27), respectivamente. Nesse estudo foi possível concluir que o emprego dos retalhos com base cranial devem utilizados para estudos em que se deseja avaliar tratamentos previstos a aumentar a viabilidade do retalho cutâneo e, base caudal para tratamentos em que são previstos diminuir a viabilidade e promovam mais necrose (Gorgulu, 2016).

## 2.5 Ozônio e ozonioterapia

### 2.5.1 História e composição

O alemão Christian Friedrich Schonbein, em 1840, observou que ao submeter a água a descargas elétricas, um odor característico era produzido que ele denominou de ozon, do grego, *ozein* (odor) (Nogales et al., 2008). Durante a I Guerra Mundial o ozônio era usado no tratamento de feridas gangrenosas dos soldados por infecção por *Clostridium*. Ainda no século XIX surgiram os primeiros geradores de ozônio e, em 1959, esses geradores foram adaptados para uso medicinal com dosagens mais precisas a partir do oxigênio puro (Penido e Ferreira, 2010).

O ozônio é uma molécula natural, encontrado na estratosfera, a uma concentração de 10ppmv (partes por milhão de volume), o que equivale a uma concentração de 0,02 microgramas/ml; é importante por proteger a terra absorvendo parte da irradiação dos raios ultravioleta que é emitido pelo sol (Bocci, 2009).

Composta por três átomos de oxigênio é altamente reativa, entre as moléculas oxidantes é o terceiro mais forte, seguido do flúor e persulfato. É formado a partir de um processo endotérmico que envolve os três átomos de oxigênio em uma reação química reversível, ou seja, se decompõe espontaneamente, sendo esse o motivo da dificuldade de armazenamento. Na prática, devido à essa instabilidade o ozônio terapêutico é gerado no momento da utilização para evitar perdas da concentração (Nogales et al., 2008).

A meia vida dessa molécula é dependente da temperatura, a 20°C a concentração de ozônio reduz pela metade em 40 minutos, já a 30°C reduz em 25 minutos (Bocci, 2006). Diversas são as aplicações do ozônio, em escala industrial

utilizado para esterilização de materiais cirúrgicos, tratamento de água devido ao seu poder bactericida e fungicida e de forma medicinal atua como anti-inflamatório e analgésico, tratamento de feridas e estimulante do sistema imune (Penido e Ferreira, 2010; Elvis e Ekta, 2011; Smith et al., 2017).

### **2.5.2 Ozônio terapêutico e mecanismo de ação**

Ozônio terapêutico tem sido utilizado para o tratamento de diversas patologias e a via tópica é a de eleição para tratamento de feridas e outras alterações dermatológicas de ordem fúngica, bacteriana e viral com resultados promissores (Zeng e Lu, 2018).

Embora o ozônio tenha efeitos tóxicos em altas concentrações para o sistema respiratório, pesquisadores comprovaram efeitos terapêuticos e os correlacionam com a dose, concentrações baixas estimulam as vias de proteção celular sem alterar sua viabilidade e em altas doses pode ter efeito genotóxico, a escolha dependerá dos objetivos terapêuticos (Elvis e Ekta, 2011).

Sua principal característica é o poder oxidativo, além de estimular a produção de antioxidantes endógenos. A instabilidade química permite uma reação instantânea a nível molecular e induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou seja, induz um estresse oxidativo transitório e moderado, sem toxicidade concomitante para o indivíduo quando as doses são respeitadas.

A dose do ozônio deve ser compatível com a capacidade antioxidante do sangue em neutralizar o sistema e, assim, formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e produtos de peroxidação lipídica (LOP's), principal responsável por estimular a produção endógena de enzimas antioxidantes tais com: a superóxido desmutase (SOD), glutadiona peroxidase (GPx), glutadiona S-transferase (GST) e catalase (CAT), heme oxigenase-1 (HO-1), NADPH quinona-oxirredutase (NQO-1) e proteínas de choque térmico (Inal et al., 2011).

Referente ao metabolismo do oxigênio a ozônioterapia aumenta o fluxo de oxigênio intracelular, pois atua na cadeia respiratória mitocondrial tornando-a mais eficiente. Adicionalmente facilita a dissociação do oxigênio para o sangue, promove aumento da atividade de prostaciclina e óxido nítrico que podem induzir a



vasodilatação em áreas isquêmicas, melhorando a perfusão local e entrega de oxigênio (Smith et al., 2017; Penido e Ferreira, 2010).

Várias são as formas de aplicação da ozonioterapia, o intervalo da dose terapêutica é amplo e a via de aplicação depende dos objetivos terapêuticos, as mais frequentes em medicina veterinária são: a auto hemomaior, auto hemomenor, aplicação direta do gás intramuscular, intradiscal ou intra-articular, insuflação intrarretal, vesical, peritoneal, exposição cutânea por meio do *bagging* ou dissolvido em solução salina ou óleos (Smith et al., 2017).

### **2.5.3 Óleo ozonizado**

#### **2.5.3.1 Estrutura química do óleo ozonizado**

Ao contrário do gás puro que é muito instável, no óleo a molécula de ozônio pode ser estabilizada, mostrando-se prático para aplicação tópica (Travagli et al., 2010). O ozônio reage com as ligações insaturadas (duplas) dos ácidos graxos encontrados nos óleos vegetais formando os ozonídeos de Criegee, hidroxihidroperóxidos, peróxido de hidrogênio e aldeídos (Zanardi et al., 2013).

Para análise de estudo e qualidade de um óleo ozonizado é necessário considerar algumas propriedades físico-químicas, como o índice de peroxidação, índice de acidez, teor de aldeído, densidade e viscosidade do óleo (Zanardi et al., 2013). O índice de peroxidação refere-se à estabilidade do ozônio no óleo é expressa em miliequivalentes de oxigênio ativo contido em 1000g de óleo e a viscosidade é uma propriedade física que indica o tempo de exposição do óleo ao ozônio, quanto maior o tempo de exposição maior a viscosidade (Travagli et al., 2010).

#### **2.5.3.2 Óleo ozonizado e cicatrização**

O óleo estabiliza a molécula de ozônio, mas quando esse óleo entra em contato com a ferida, ele se dissocia lentamente em ozônio reativo que se dissolve no plasma, gerando peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e LOPs, justificando sua atividade desinfetante e estimuladora, assim o que diferencia sua ação seria a concentração, para cada fase da injúria, seja ação anti-inflamatória, regenerativa ou remodeladora,

os óleos devem apresentar alta, média e baixa concentração, respectivamente (Bocci, 2006).

Bocci (2009) ao sugerir diferentes concentrações para solução ozonizada, para feridas contaminadas, refere-se a concentrações maiores de ozônio de 20 microgramas/mL, por outro lado, para feridas em fase de proliferação e remodelação indica soluções mais suaves na concentração de 5 microgramas/ml de ozônio.

Estudos experimentais e clínicos demonstraram que o óleo ozonizado por via tópica contribui para o fechamento de feridas agudas e crônicas, aumenta a neovascularização por aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), propriedades antioxidantes e propriedades antimicrobianas e antifúngicas que também auxiliam o tratamento de feridas (Anzolin et al., 2020).

Pesquisadores chineses demonstraram que o óleo ozonizado facilitou a cicatrização de feridas em camundongos através da migração de fibroblastos via sinalização PI3K/Akt/mTOR, a compreensão desses mecanismos moleculares amplia a possibilidade de novas pesquisas via alvo terapêutico com óleo ozonizado (Xiao et al., 2017).

### 3. REFERÊNCIAS

Amsellem P (2011) Complications of reconstructive surgery in companion animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice** 41: 995–1006

Anzolin AP, Silveira-Kaross NL, Bertol CD (2020) Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? **Medical Gas research** 10:54-59

Bocci VA (2006) Scientific and medical aspects of ozone therapy: State of the art. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia** 5:93–104

Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I, Scho CF (2009) The Ozone Paradox : Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug. **Medicina Research Review** 29:646–682

Brioschi M (2015) Termometria cutânea: novos conceitos. **Journal Vascular Brazil** 2:151-160

Camargo CP, Margarido NF, Guandelini E, Barrucci B, Vieira GA (2014) Description of a new experimental model skin flap for studying skin viability in rats. **Acta Cirurgica Brasileira** 29:166–170

Campbell KL, Lichtensteiger CA (2004) Structure and function of the skin. In: Campbell KL (Ed.). **Small Animal Dermatology Secrets**. Chile, p. 1-9.

Castro JLC, Huppes RR, De Nardi AB, Pazzini JM (2015) **Princípios e Técnicas de Cirurgias Reconstructivas da Pele de Cães e Gatos (Atlas Colorido)**. 1ª ed. Medvep: Curitiba, 286p.

Elvis AM, Ekta JS Ozone therapy: A clinical review (2011) **Journal of Natural Science, Biology and Medicine** 2:66–70

Gorgulu T (2016) Selection of Appropriate Pedicle for Dorsal Skin Flap Studies on Rats. **The Medical Bulletin of Sisli Etfal Hospital** 50:93-96 of n. July

Harder Y, Amon M et al. (2008) An old dream revitalised: preconditioning strategies to protect surgical flaps from critical ischaemia and ischaemia-reperfusion injury. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery** 61: 503–511

Huppes RR, et al. Cuidados pré, trans e pós-cirúrgico. In: Castro JLC, Huppes RR, De Nardi AB, Pazzini JM (2015) **Princípios e técnicas de cirurgias reconstructivas da pele de cães e gatos (atlas colorido)** Curitiba: MedVep p:8-50

Inal M, Dokumacioglu E, Ozcelik, Ucar O (2011) The effect of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress marker in healthy subjects. **Irish Journal of Medical Science** 180: 703-707

León, OS, Menéndez, S, Merino, N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V (1998) Ozone oxidative preconditioning: A protection against cellular damage by free radicals. **Mediators of Inflammation** 7:289–294

Mankin, KT (2017) Axial Pattern Flaps. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 47: 1237–1247

Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE (1983) The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Annals of Surgery* 198: 87–90

McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA (1965) The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plastic Reconstructive Surgery* 5:177

Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovick EO, Marques JLL (1998) Ozone Therapy in Medicine and Dentistry. *The Journal of Contemporary Dental Practice*

Nogueira CHFV, Nogueira CF, Ely JB (2015) Termografia por infravermelho em cirurgia plástica – novos horizontes. *Pan American Journal of Medical Thermoligy* 2:81-87

Nowicka D (2017) Thermography Improves Clinical Assessment in Patients with Systemic Sclerosis Trated with Ozone Therapy. *Biomed Research International*

Pavletic MM (Ed.) (2018) *Atlas Of Small Animal Wound Management And Reconstructive Surgery*. Iowa, 860p.

Pazzini JM, De Nardi AB, Castro JLC, Huppes RR. Cirurgia Reonstrutiva aplicada na oncologia. In: Daleck CR, De Nardi AB (2016) *Oncologia em cães e gatos*. 2ed. Rio de Janeiro: Editora Rocca Ltda. 278-291.

Penido BRC, De AL, Ferreira LFL (2010) Aplicações da ozonioterapia na clínica veterinária. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia* 4:28-30

Picanço LL, De Oliveira A, De Lima Silva JJ (2012) Electroacupuncture attenuates oxidative stress in random skin flaps in rats. *Aesthetic Plastic Surgery* 36:1230–1235

Scheffer, JP, Atallah, FA, Gomes, C, et al. (2013) Cirurgia reonstrutiva no tratamento de feridas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 35:70–78

Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, VAtsia S, Ali Khan S (2017) Ozone therapy: na overview of pharmacodynamics, current research, and crinical Utility. *MedicalGas Research* 7: 212-219

Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V (2010) Ozone and ozonated oils in skin diseases: A review. **Mediators of Inflammation**

Zhou KL, Zhang YH, Lin DS, Tao XY, Xu HZ (2016) Effects of calcitriol on random skin flap survival in rats. **Scientific Reports** 6:1–10

Zanardi I, Borrelli E, Valacchi G, Bocci V (2010) Ozone and ozonated oil in skin disease: a review. **Mediators of Inflammation**

Zeng J, Lu J (2018) Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin disease. **International Immunopharmacology** 56:235-241

Wardlaw JL, Lanz OI. (2012) Axial pattern and myocutaneous flaps. In: Tobias K, Johnston S, editors. **Veterinary surgery small animal**. St Louis (MO): Elsevier Saunders 1256–70p

Xiao W, Tang H, Wu M, Liao Y, Li K, Li L, Xu X (2017) Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3k/Akt/mTOR signaling pathway. **BioScience Research** 37: 1-11

Zeng J, Lu J (2018) Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin disease. **International Immunopharmacology** 56:235-241

## **CAPÍTULO 2 – Reparação do retalho axial dorsal em ratos tratados com óleo ozonizado**

**RESUMO** – Os retalhos de padrão axial são uma das opções em cirurgia reconstrutiva. Eles são constituídos por uma artéria e uma veia cutânea direta em sua base e permitem que grande área de pele possa constituir o retalho para recobrir a ferida. Entretanto, podem apresentar complicações como necrose devido ao comprometimento vascular. Logo, a ozonioterapia pode ser utilizada para acelerar o processo de cicatrização de feridas pouco vascularizadas e contaminadas, contudo pouco se sabe sobre o seu comportamento em cirurgias reconstrutivas. Assim sendo, objetivou-se avaliar os efeitos e o reparo do retalho axial dorsal em ratos Wistar ao leito receptor, empregando tratamento com óleo ozonizado de alta peroxidação. Realizou-se no Hospital Veterinário da UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, um estudo com 18 ratos, distribuídos em dois grupos com 9 animais. Os Grupos foram GG (óleo de girassol) e GO (óleo de girassol ozonizado). Durante o período experimental foram realizadas avaliações macroscópica (exudato, edema, coloração, necrose e aspecto cosmético) mensuração da área total, área de necrose e porcentagem de necrose do retalho) e microscópica (hemorragia, necrose, reepitelização, contagem de monoclucleados e polimorfonucleados, proliferação vascular e diferenciação do tipo de colágeno) a fim de observar a cicatrização e a reparação da ferida cirúrgica. Os dados foram submetidos a análise estatística (teste ANOVA e teste Qi-quadrado,  $p < 0,05$ ). O aspecto cosmético no GO foi significativamente melhor que GG. A contagem de vasos sanguíneos, hemorragia e reepitelização foi significativamente maiores no GO quando comparado ao GG, enquanto a presença de mononucleares, polimorfonucleares, necrose não diferiram entre os grupos. A média da área total dos retalhos entre os grupos diferiu estatisticamente, foi maior nos retalhos em GO. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que a utilização do óleo ozonizado em retalho de padrão axial resulta em aspecto cosmético favorável e melhor repitelização no grupo tratado.

**Palavras-chave:** Ozonioterapia, cirurgia reconstrutiva, angiogênese, colágeno

## 1 Introdução

O emprego de cirurgias reconstrutivas para recobrimento de feridas traumáticas extensas ou após exérese de tumor com amplas margens cirúrgicas permite o fechamento precoce da ferida e evita o excesso de contratura cicatricial quando comparado ao fechamento por segunda intenção (Pavletic, 2018).

Os retalhos de padrão axial são uma das opções em cirurgia reconstrutiva, incorporam uma artéria e veia cutânea direta em sua base (angiossoma), isto permite que uma grande área de pele possa constituir o retalho para recobrir a ferida (Mankin, 2017). São transferidos no mesmo momento cirúrgico, são robustos e não necessitam de tecido de granulação do leito receptor, um dos cuidados é garantir que o angiossoma esteja viável para fornecer o suprimento necessário para sua sobrevivência. Normalmente a taxa de sobrevivência é alta, quando ocorre a falha parcial é característico a necrose na sua extremidade distal (Pavletic, 2018).

Em vista destes problemas, autores tem reportado o emprego de substâncias que possam auxiliar a cicatrização e estimulação de angiogênese em modelos experimentais de retalho cutâneo dorsal de padrão axial em ratos (Pedretti *et al.*, 2017; Ersel *et al.*, 2016).

A ozonioterapia é utilizada para acelerar o processo de cicatrização de feridas pouco vascularizadas e contaminadas (Kushmakov *et al.*, 2018), contudo pouco se sabe sobre o comportamento em cirurgias reconstrutivas.

Mediante essa problemática, o objetivo deste estudo foi avaliar o reparo tecidual por meio da análise macroscópica e histoquímica de retalho cutâneo de ratos Wistar tratados com óleo ozonizado de alta peroxidação. Desse modo, determinando a possível aplicação do óleo ozonizado como adjuvante em cirurgias reconstrutivas na rotina clínica cirúrgica veterinária.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Seleção dos pacientes

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal<sup>1</sup>.

Foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), saudáveis, machos, adultos, com peso entre 250-300 gramas provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Câmpus de Botucatu.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, forradas com maravalha de pinho, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura ambiente controlada próxima a 23°C, com ração comercial e água *ad libitum*.

### 2.2 Protocolo anestésico e procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico todos os ratos foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico composto por medicação pré-anestésica com midazolam (2mg/kg) e cetamina (40mg/kg) por via intramuscular e posterior aplicação de metadona (1 mg/kg) pela mesma via. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano na dose de 1 a 3 % diluído em 100% de oxigênio, utilizando o vaporizador anestésico para manutenção do plano cirúrgico. Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo indivíduo.

Os animais foram preparados para o procedimento cirúrgico, inicialmente foi realizada a tricotomia da região do dorso, desde as escápulas até a última vértebra coccígea seguido por limpeza e antissepsia com clorexidine degermante e álcool 70%, com auxílio de gaze estéril.

Na sequência, posicionou-se o animal em decúbito ventral, procedeu-se a colocação dos panos de campos e iniciou-se a confecção do retalho cutâneo dorsal. Seguindo a medida de 10 cm de comprimento por 3 cm de largura foram criados os retalhos conforme a padronização do modelo de McFarlene modificado (Camargo et al., 2014). A demarcação do retalho foi realizada com caneta própria para demarcação em pele (Texta 700®). As referências anatômicas foram: o ângulo inferior das

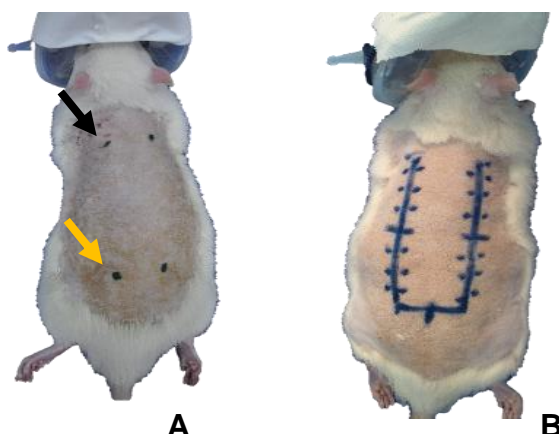
---

<sup>1</sup> Protocolo CEUA número: Protocolo nº011163/18.

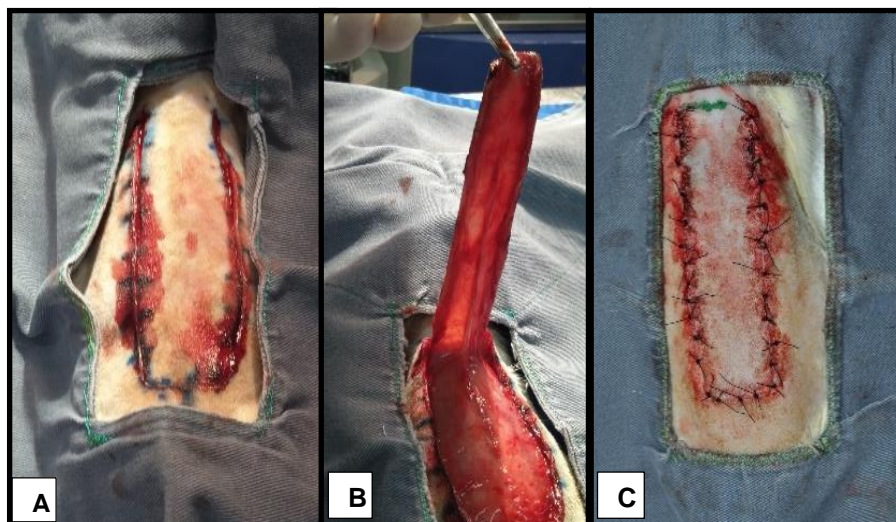


escápulas e as cristas ilíacas, centralizado sobre a coluna vertebral (Figura 1A e B). Em condições estéreis, após a incisão para demarcar o retalho (Figura 2A), este foi divulsionado incluindo o panículo carnososo até a base cranial para ser elevado (Figura 2B) e reposicionado de volta ao leito original para dermorrafia com sutura em padrão simples interrompido, com pontos equidistantes a cada 1 cm, empregando Nylon 3-0 (Figura 2C). Os animais receberam nos sete dias subsequentes pela via intradérmica, cloridrato de peptidina (10mg/kg), a cada 24 horas para analgesia.

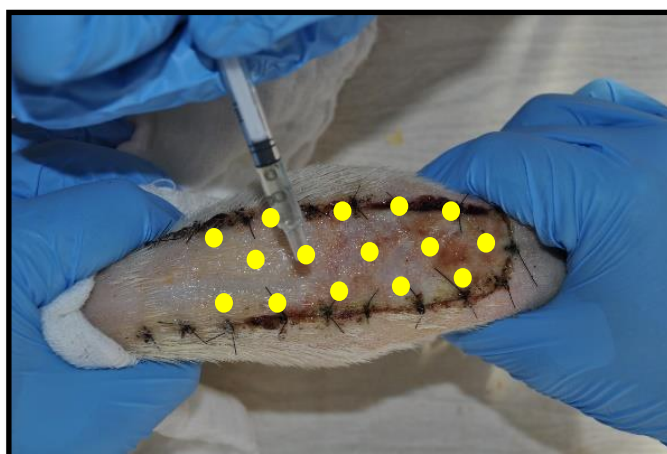
Os animais foram distribuídos em dois grupos, sendo nove ratos pertencentes ao grupo óleo de girassol (GG) e nove ratos ao grupo óleo de girassol ozonizado (GO). O tratamento preconizado foi aplicar 1 ml com auxílio de uma seringa revestida por silicone (BD-Ultra-fine®) de óleo de girassol ou óleo de girassol ozonizado (concentração de 70 µg/mL) no grupo GG e GO, respectivamente, entre o retalho e o leito receptor no momento trans-cirúrgico e no pós-operatório, por via tópica (duas vezes por dia), na superfície do retalho, por 7 dias consecutivos (Figura 3).



**Figura 1:** Imagem fotográfica do procedimento cirúrgico do retalho cutâneo dorsal em rato Wistar. Marcação de retalho cutâneo dorsal em rato Wistar com caneta dermatográfica Texta 700®. **(A)** A base do retalho cranialmente foi delimitada pelo ângulo inferior da escápula (seta preta) e caudalmente pela crista ilíaca (seta amarela). Em **(B)** a demarcação dos limites do retalho cutâneo dorsal segundo modelo de McFarlene modificado com dimensões de 10 cm de comprimento por 3 cm de largura. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.



**Figura 2:** Imagem fotográfica do procedimento cirúrgico visando a confecção de retalho cutâneo dorsal em rato Wistar. Em **(A)** incisão do retalho com base cranial com auxílio de bisturi. Em **(B)** elevação do retalho após incisão da pele, divulsão do tecido subcutâneo e panículo carnososo. Em **(C)** dermorrafia com nylon 3-0 em pontos simples separado após reposicionamento do retalho no leito doador. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.



**Figura 3:** Imagem fotográfica do retalho cutâneo demonstrando esquematicamente a distribuição da aplicação do óleo sobre o retalho e ao redor da ferida cirúrgica com auxílio de uma seringa de 1 ml. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.

### 2.3 Eutanásia e coleta de material

No 15º dia de pós-operatório todos os animais foram submetidos à eutanásia com pentobarbital de sódio (250mg/kg), por via intraperitoneal, obedecendo-se os

princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

As medidas do retalho foram coletadas pelo método de gabarito descrito por Sasaki e Pang (1980) e calculadas em cm<sup>2</sup> pelo software Image J®. Três amostras de cada retalho foram coletadas e imersas em solução de formol à 10% e após 48h transferidas para solução de álcool 70% até o momento do processamento, visando a confecção das lâminas de microscopia.

#### **2.4 Avaliação macroscópica**

Avaliações macroscópicas foram realizadas no 3º, 7º e 14º dia pós-operatório. As variáveis observadas foram presença de edema, exudato, necrose, coloração e aspecto cosmético, sendo as variáveis quantificadas de 0 a 4, exceto necrose, esta quantificada de 0 (ausente) a 1 (presente), conforme preconizado por Paim et al. (2002) (Apêndice A).

#### **2.5 Avaliação microscópica**

As amostras foram processadas conforme a rotina convencional de processamento histológico. As amostras foram conservadas em formalina 10% por 48 horas, em seguida, transferidas para solução de álcool 70% até o momento de processamento para a inclusão em parafina, submetidas a cortes transversais em micrótomo, com espessura de 4 µm e coradas pelo método histoquímico de rotina com Hematoxilina e eosina (HE) e com a coloração de Picrosirius Red (Campos et al., 2007) para avaliação do tipo de colágeno. Na coloração de HE foram avaliadas a epiderme e derme quanto à presença de necrose, células polimorfonucleares, células mononucleares, hemorragia e repitelização. Os dados obtidos foram classificados de acordo com a intensidade em que foram encontrados e transformados em variáveis semiquantitativas mediante atribuição de índice para o achado histológico, conforme preconizado por Garros *et al.* (2006) e registrados em fichas individuais para cada animal. A quantificação de vasos foi determinada pela técnica de contagem de microvasos, foi considerado um vaso unitário qualquer grupo de células endoteliais, assim como também vasos contendo hemácias em seu lúmen. A contagem foi realizada em cinco campos, previamente selecionados pela maior densidade vascular

na profundidade da lesão com microscópio ajustado para uma ampliação de 400x e expresso em um valor médio de vasos para cada caso estudado semelhante ao estudo realizado por Pazzini, *et al.* (2017).

Para a avaliação do colágeno foi empregada a coloração de Picrosirius. Os dados foram analisados por microscopia sob luz polarizada (Olympus BX-53®, Japão). A observação das fibras colágenas por esse método permitiu a diferenciação do colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (verde). De cada lâmina foram selecionados e fotomicrografados dez campos histológicos com uma câmera digital (5,0 m) no aumento de 20x. As imagens foram analisadas com o auxílio do software Image J®, com o plug-in Color Threshold, obtendo-se o percentual de colágeno pela análise de partículas automatizadas de acordo com a seleção e extensão das áreas baseadas na cor, conforme descrito na literatura (Beyota *et al.*, 2016).

A análise dos cortes histológicos foi realizada pelo mesmo patologista sem o conhecimento prévio da identificação dos grupos. A avaliação histológica das lâminas foi realizada em microscópio óptico no aumento de 400x. As fotomicrografias foram realizadas no programa Motic Images Plus 2.0.

### **3 Análise estatística**

Para as análises estatísticas relacionando as variáveis categóricas macroscópicas (edema, exsudato, necrose, coloração e aspecto cosmético) foi realizado a correlação entre o grupo controle e experimental dos ratos utilizando a correlação de Pearson. Em todos os testes, valores de  $p$  iguais ou inferiores a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) foram considerados significativos.

As médias obtidas das avaliações microscópicas e porcentagem das avaliações macroscópicas em relação ao grupo controle e experimental foram submetidas à análise de variância (ANOVA) com diferença significativa entre as médias ( $p \leq 0,05$ ).

Os dados de colagenização dos diferentes tipos de fibras colágenas, segundo o grau de diferenciação foram comparados por análise de variância (ANOVA) para um delineamento inteiramente ao acaso, considerando os valores de  $p$  iguais ou inferiores a 0,05. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa computacional R.

## 4 Resultados

Dos 18 animais, um foi excluído do experimento por óbito, portanto, no estudo foram avaliados 17 animais distribuídos em dois grupos, sendo 8 animais do grupo tratado com óleo de girassol ozonizado (GO) e 9 animais tratados com óleo de girassol (GG).

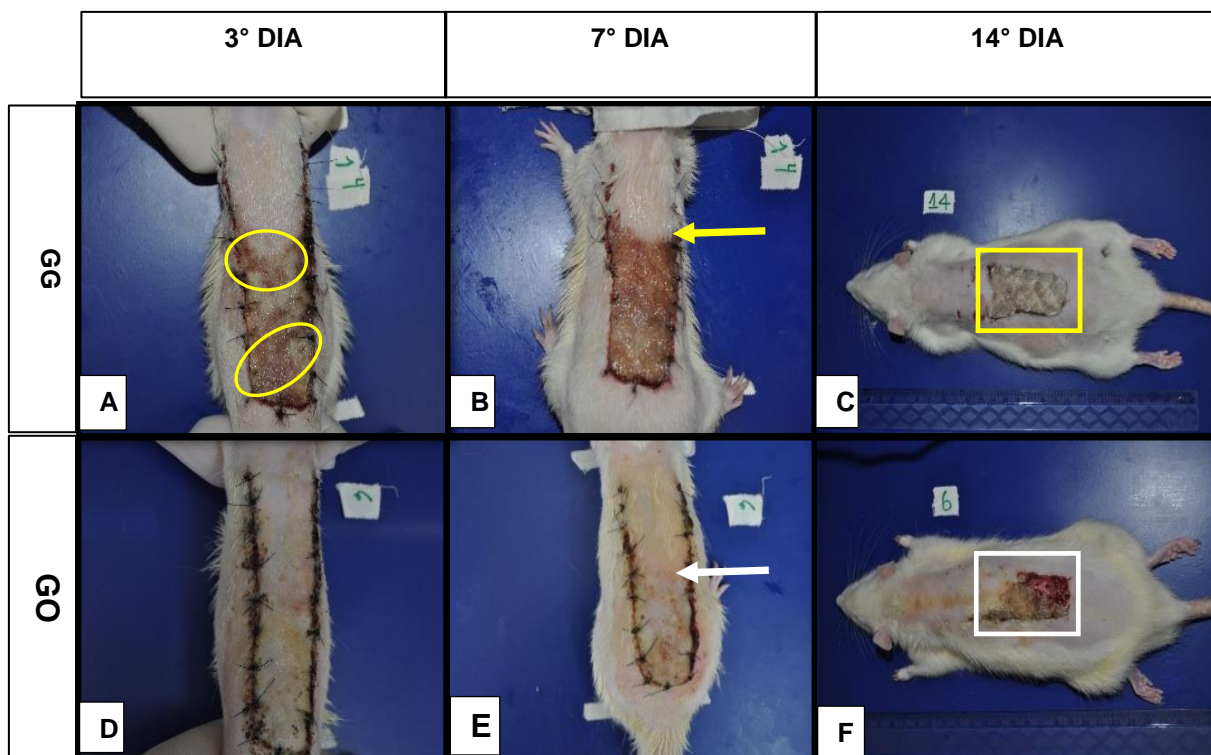
### 4.1 Avaliação macroscópica

Quanto à avaliação macroscópica, observou-se que o retalho cutâneo apresentou evolução para necrose na porção médio distal da ferida em todos os animais, iniciando-se com exsudação, edema e hiperemia até o 3º dia, progredindo para necrose bem delimitada a partir do 10º dia de pós-operatório (Figura 4).

Em todos os tempos avaliados 3, 7 e 14 dias de pós-operatório o aspecto cosmético foi significativo ( $p= 0,046$ ), com melhor aspecto no grupo tratado com óleo de girassol ozonizado em relação ao grupo óleo de girassol. Segue abaixo quadro comparativo das qualidades macroscópicas observadas no GG e GO em momentos distintos (Quadro 1).

**Tabela 1:** Evolução qualitativa macroscópica de coloração, necrose, exudato e edema e aspecto cosmético em três diferentes momentos, 3º, 7º e 14º dia pós-operatório em retalhos cutâneos dorsais de ratos Wistar tratados com óleo de girassol (GG) e óleo de girassol ozonizado (GO). FCAV/UNESP, 2019.

Características macroscópicas	GG			GO		
	3º dia	7º dia	14º dia	3º dia	7º dia	14º dia
Edema	Moderado	Moderado/Discreto	Discreto	Moderado	Moderado/Discreto	Discreto
Exsudato	Moderado	Discreto	Ausente	Moderado	Discreto	Ausente
Aspecto cosmético	Bom	Bom/Regular	Regular	Excelente/Bom	Bom	Bom
Necrose	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente
Coloração	Hiperêmico	Hiperêmico	Enegrecido	Hiperêmico	Pálido	Enegrecido



**Figura 4:** Fotografias comparativas dos retalhos cutâneos dorsais em ratos no GG e GO nos três momentos de avaliação. – Aparência do retalho cutâneo no 3° dia (A e D), 7° dia (B e E) e 14° dia (C e F) de pós-operatório. Notar área hemorrágica da porção distal do retalho (círculos). Notar a demarcação da área de necrose e área viável (seta amarela). Observar área pálida bem demarcada por uma linha horizontal (seta branca). Notar a diferença de retração cicatricial do GG (retângulo amarelo) e GO (retângulo branco). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.

#### 4.2 Planimetria digital

A porcentagem de necrose dos dois grupos foram avaliadas (Tabela 1). A média da porcentagem da necrose do GG e GO foram 62,82% (35,51 - 85,21) e 50,82% (30,922 - 77,71) respectivamente, os valores mostram que não houve diferença significativa referente à porcentagem de necrose entre os dois grupos.

**Tabela-2:** Porcentagem de necrose de retalhos cutâneos dorsais de ratos Wistar submetidos ao procedimento cirúrgico na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.

Grupo	N	Necrose (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Valor p*
GG	9	<b>62,82</b>	<b>35,51</b>	<b>85,21</b>	0,19725
GO	8	<b>50,82</b>	<b>30,92</b>	<b>77,71</b>	

Nota: \* Diferença entre grupos óleo de girassol (GG) e óleo de girassol ozonizado (GO)

Os valores médios da área total do retalho de GG e GO foram 25,24 cm<sup>2</sup> ( $\pm$  7,14) e 31,83 cm<sup>2</sup> ( $\pm$  3,28) respectivamente. Os valores médios da área total do retalho à análise de variância (ANOVA) demonstrou diferença significativa ( $p= 0,000031$ ) em GO em relação ao GG (Tabela 2).

**Tabela-3:** Valores médios da área total de retalhos cutâneos dorsais dos grupos submetidos ao procedimento cirúrgico na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.

Grupo	N	Área total (cm <sup>2</sup> )	Variância	Valor p
GG	9	<b>25,24</b>	$\pm$ 7,14	0,000031***
GO	8	<b>31,83</b>	$\pm$ 3,28	

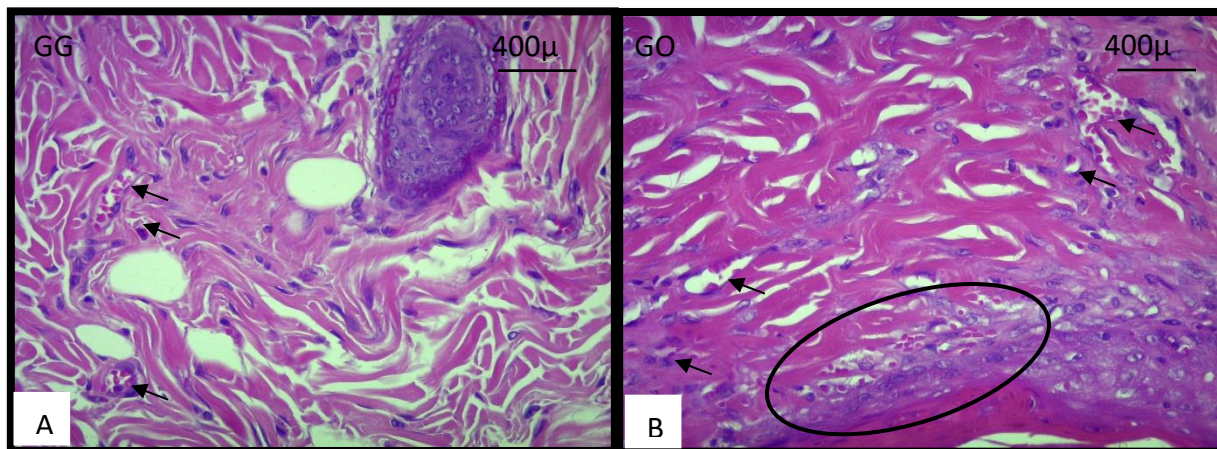
\*0,05<p<0,01

\*\*0,01<p<0,001

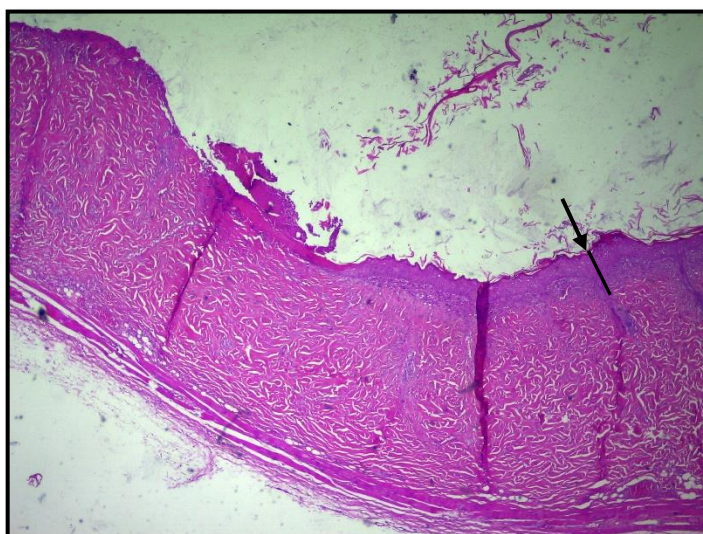
\*\*\* 0,001<p

### 4.3 Avaliação microscópica

Para a avaliação histológica, a média da quantificação de vasos, hemorragia e re-epitelização pelo método de HE foi significativa entre os grupos ( $p<0,05$ ), para GG a média de vasos foi 3,64 ( $\pm$ 13,53) e para GO a média de vasos foi 14,45 ( $\pm$ 17,83). Na figura 5 encontra-se a representação da quantidade de vasos observados nos grupos GG e GO. Hemorragia ( $p= 0.03$ ) e re-epitelização ( $p=0,01$ ) (Figura 6) foram significativamente maiores no GO em relação ao GG. Quanto à presença de células mononucleares (macrófagos) e polimorfonucleares (neutrófilos) não foram observadas diferenças significativas entre o GG e GO ( $p =0.46$  e  $p=0,37$ , respectivamente).



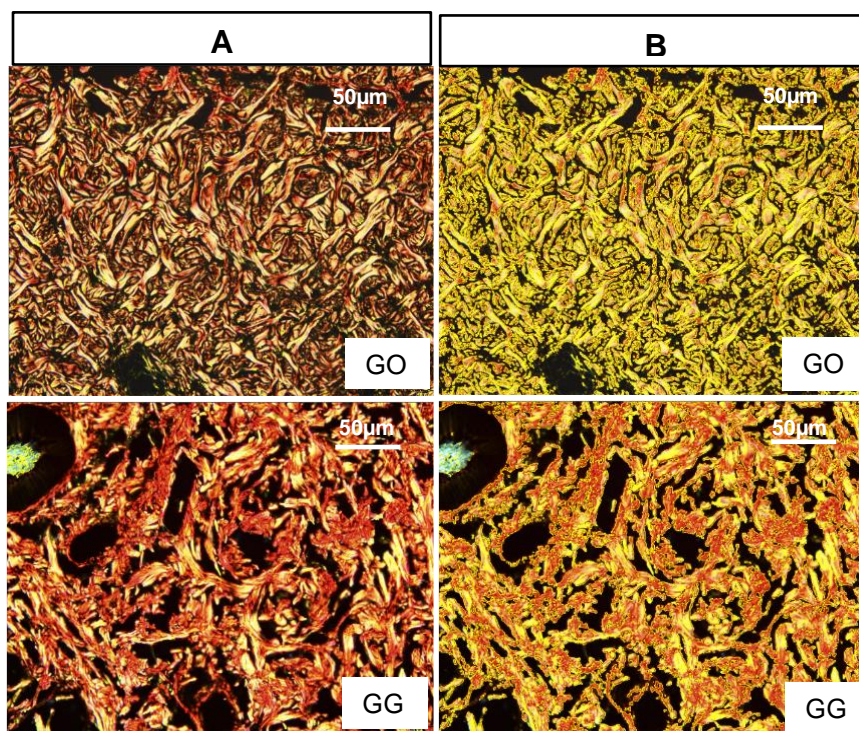
**Figura 5** – Fotomicrografia da derme de rato submetido ao procedimento de retalho de padrão axial no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, 2019. (A) Vaso sanguíneo identificado (seta) em GG. (B) Presença de maior neovascularização na área circunscrita e identificação de vasos (seta) no GO. HE em aumento de 400x



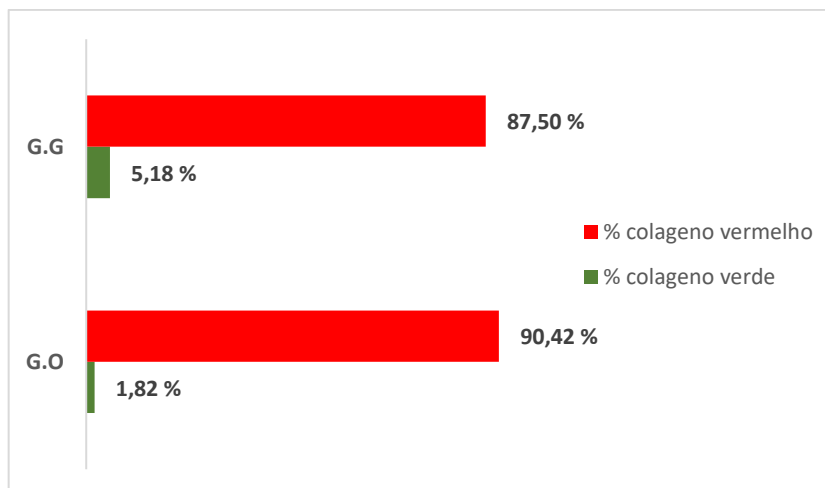
**Figura 6** – Fotomicrografia de derme e epiderme em ratos submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Campus Jaboticabal, 2019. Notar a intensidade da re-epitelização (seta) dos ratos tratados com óleo de girassol ozonizado. HE em aumento de 200X



Não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os grupos GO e GG em relação as porcentagens do colágeno tipo I (vermelho - maduro) e tipo III (verde - imaturo) (Figura 7). Em ambos os grupos se observou predomínio das fibras colágeno tipo I em comparação ao colágeno tipo III (Figura 8).



**Figura 7** – Fotomicrografia com microscópio de luz polarizada analisada Olympus BX-53 das áreas de transição dos retalhos cutâneos dorsais em ratos da linhagem Wistar após 15 dias de pós-operatório do procedimento de cirurgia reconstrutiva no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Campus Jaboticabal, 2019. (A) fotomicrografia empregando software Image J delimitam em amarelo o local de captura das imagens para quantificação de colágeno tipo III (fibras em verde). (B) fotomicrografia analisada pelo software Image J delimitam em amarelo o local de captura das imagens para quantificação de colágeno tipo I (fibras em vermelho)



**Figura 8** – Representação gráfica em colunas da porcentagem média de expressão de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) para o GG e GO – Observar predominância de colágeno vermelho em ambos os grupos. Entre grupos não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), 2019.

## 5 Discussão

A utilização do óleo ozonizado nesta pesquisa, apresentou influência positiva sobre o processo de reparação do retalho cutâneo dorsal em ratos, o mecanismo de ação deste composto sobre retalhos cutâneos ainda não foi completamente elucidado, no entanto efeitos pró angiogênicos já foram descritos por Kirkil et al. (2016).

Alguns autores referem que parte da necrose do retalho cutâneo se deve à reperfusão pós-isquêmica. Após injúria tecidual ocorre aumento de radicais livres de oxigênio a níveis críticos, logo após a reperfusão de sangue aos tecidos e os mecanismos antioxidantes endógenos são insuficientes para equilibrar o estresse oxidativo, o que gera lesão tecidual por peroxidação lipídica da membrana celular (FREITAS et al., 2002; CYMROT, PERCÁRIO & FERREIRA, 2004).

Neste estudo foi utilizado o óleo ozonizado por ser descrito na literatura que o ozônio age também como sinalizador do estresse oxidativo responsável por estimular a via antioxidante endógena (Valacchi et al., 2011). Contudo mais estudos são necessários para detectar em valores as medidas da capacidade antioxidante do indivíduo tratado com ozônio terapia que não pode ser avaliada de modo direto no presente estudo.

A definição da concentração empregada neste estudo foi pela disponibilidade do óleo ozonizado já disponível comercialmente e recomendado para o reparo de feridas dérmicas, foi utilizado óleo ozonizado na concentração de 70mcg/ml, considerado de alta peroxidação. Alguns autores levantaram a discussão da importância do índice de peroxidação do óleo ozonizado no reparo de ferida (Valacchi et al., 2011) e outros apontam resultados sem mencionar a concentração de ozônio empregada no estudo, neste aspecto consideramos ser importante para padronizar a correlação de efeito e concentração do produto para futuras discussões.

Neste estudo optou-se pela observação por 14 dias após procedimento cirúrgico, de forma a assegurar a definição completa da área de necrose do retalho. Estudos demonstram que a vascularização do retalho cutâneo ainda é dependente da vascularização do pedículo até o 7º dia e a partir desse momento os vasos neoformados do leito receptor passam a auxiliar na vascularização do retalho cutâneo, e que a partir do 10º essa neovascularização é suficiente para manutenção do retalho (Collins, Cotran e Kumar, 2000). Em nosso experimento a área de necrose e área viável ficou definida a partir do décimo dia.

Não foi observado diferença estatística entre grupos quanto à porcentagem média de necrose do retalho após 14 dias de tratamento. Nos estudos de Kirkil et al. (2016), avaliou a viabilidade de retalhos cutâneos em ratos tratados com azeite de oliva ozonizado após 7 dias também não observaram diferença entre grupos referente a porcentagem média de necrose do retalho (Kirkil et al., 2016).

Em todos os retalhos cutâneos foi observado necrose na porção médio distal e porcentagem de necrose semelhante de estudos anteriores o que demonstra padronização e consistência técnica, dificuldade observada em alguns estudos que também utilizam o modelo experimental de retalho cutâneo dorsal para estudos comparativos futuros (Camargo et al., 2014; Cymrot, 2004).

Nos estudos de Gorgulu (2016) a porcentagem média de necrose em retalhos cutâneos com pedículo cranial foi de 54,54% (13,80-81,20) comparado aos 50,82 (30,922 - 77,71) do GO e 62,82% (35,51 - 85,21) do GG deste estudo.

A contagem de microvasos para a determinação do índice de angiogênese foi determinada pelo método quantitativo, como exposto nos estudos de Pazzini et al. (2017), que comparou o método sob colorações diferentes em Hematoxilina Eosina

(HE) e Tricômio de Manson e não observou diferença estatística entre os métodos e que para contagem de vasos ambos foram considerados confiáveis para avaliação da angiogênese de enxertos de pele em coelhos. Uma consideração importante é que a técnica utilizada para contagem de vasos em HE, foi um método simples, de baixo custo e facilmente reproduzível.

Assim, o grupo GO apresentou porcentagem média de vasos maior que o grupo controle o que corrobora com o trabalho Kirkil et al. (2016), comprovando efeitos benéficos do óleo ozonizado para a neovascularização e conseqüentemente melhor reparo de feridas dérmicas em ratos.

Estudos anteriores identificaram que feridas em ratos tratados com óleo ozonizado estimulou a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e foi correlacionado a maior contagem de vasos (Xiao, 2017). A expressão de VEGF foi identificado em fibroblastos dérmicos, células endoteliais e fibras de colágeno (Kim et al., 2009).

A presença discreta de mononucleares e polimorfonucleares podem ser justificadas pelo tempo de avaliação da ferida (14 dias), nesse momento quando o material foi coletado para análise a ferida não se encontrava mais na fase inflamatória. Quando se avaliou o colágeno total e as diferentes fibras colágenas (tipo I e III) neste estudo, mesmo não havendo diferença significativa entre as variáveis categóricas foi possível observar na microscopia óptica uma melhor organização das fibras colágenas do GO em relação ao GG aos 14 dias, com isso podemos inferir uma correlação positiva entre a quantidade/qualidade do colágeno e o tamanho total do retalho que foi melhor no GO.

Outro fator importante a ser considerado é que se espera maior presença fibras colágeno tipo I aos 14 dias, isso é indicativo de melhor evolução do processo de cicatrização, uma vez que o colágeno tipo I corresponde a forma madura do colágeno tipo III (Rodrigues *et al.* 2018).

Estudos apontam para a atividade do óleo ozonizado no processo de reparo de feridas dérmicas, observaram melhor fechamento da ferida conseqüente melhor deposição de colágeno e maior atividade de fibroblastos após sete dias de ferida (Travagli et al., 2010; Kim et al. 2009).

Diante disto há comprovações de que o óleo ozonizado influencia de maneira direta na síntese de colágeno e proliferação de fibroblastos durante a formação do tecido de granulação e fase inicial de remodelação do tecido de cicatrização da ferida (Xiao et al., 2017). Esta avaliação apresentou limites por não ser possível a coleta os 7 dias de tratamento.

A maior área total do retalho cutâneo em GO observada na avaliação macroscópica permite inferir a correlação de menor fibrose cicatricial. Uma hipótese seria a ação dos miofibroblastos nas propriedades mecânicas do tecido e sua permanência na lesão poderiam levar a fibrose cicatricial (Masseno et al., 2010) excessiva. Mais estudos devem ser avaliados dentro deste contexto biomecânico.

A re-epitelização foi maior no GO, sendo assim, a melhor resposta vascular mediante a aplicação de óleo de girassol ozonizado é considerada fator positivo para a re-epitelização, esses achados são condizentes com Pazzini et al. (2016) em que a aplicação de plasma rico em plaquetas promoveu maior angiogênese e consequente maior re-epitelização em enxertos cutâneos.

## 6 Conclusão

O óleo ozonizado influencia na vitalidade do retalho cutâneo e o processo de reparação tecidual. Os animais tratados com óleo ozonizado apresentaram neovascularização e aspecto cosmético superiores ao grupo controle que apresentaram menor fibrose cicatricial. Entretanto, em nenhum dos grupos modificou a porcentagem de necrose distal do retalho cutâneo.

## 7 Referências

Camargo CP, Margarido NF, Guandelini E, Barrucci B, Vieira GA (2014) Description of a new experimental model skin flap for studying skin viability in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira** 29:166–170

Cymrot M, Prcário S, Ferreira LM (2004) Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. **Acta Cirúrgica Brasileira** 19: 18-26

Collins T, Cotran RS, Kumar V (2000) Inflamação aguda e crônica. In: Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6 ed. p.44-78

Ersel M, Uyanikgil Y, Karbek K, Akarca F, *et al.* (2016) Effects of Silk Sericin on Incision Wound Healing in a Dorsal Skin Flap Wound Healing Rat Model. **Medical Science Monitor** 22:1064–1078

Freitas FAS, Piccinato CE, Campos AD, Cherri J (2002) Estuda da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** 17: 74-78

Garros IC, Campo ACL, Tâmbara EM, *et al.* (2006) Extrato de passiflora edulis na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 21: 55-65

Gorgulu T (2016) Selection of Appropriate Pedicle for Dorsal Skin Flap Studies on Rats. **The Medical Bulletin of Sisli Etfal Hospital** 50:93-96 of n. JulyKirkil C *et al.* The effect of ozonated olive oil on neovascularization in a experimental skin flap model. **Advances in skin & wound care** 29:322-327

Kim SH, Noh SU, Han YW, Kim KM, Park YM. (2009) Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. **Journal of Korean Medical Science** 24: 368-374

Kirkil C, *et al.* (2016) The effect of ozonated olive oil on neovascularization in a experimental skin Flap model. **Advances in Skin and Wound Care** 29: 322-327

Kushmakov R, Gandhi J, Seyam O, *et al.* (2018) Ozone therapy for diabetic foot. **Medical Gas Research** 8: 111

Mankin, KT (2017) Axial Pattern Flaps. *Veterinary Clinics of North America* - **Small Animal Practice** 47: 1237–1247

Masseno APB, Porto CD, Nunes LD, Sequeira JL, Alvarenga MA (2010) Miofibroblastos: Revisão de literature. **Veterinária e Zootecnia**. 17: 177-190

Paim CBV, Raiser AG, Cardoso E, Beck C (2002) Enxerto autólogo de pele em malha de espessura completa na reparação de feridas carpometacarpianas de cães – resposta à irradiação laser AsGa. **Ciência Rural** 32: 451-457.

Pavletic MM (Ed.) (2018) **Atlas Of Small Animal Wound Management And Reconstructive Surgery**. Iowa, 860p.

Pazzini J, et al (2016) Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) **Pesquisa Veterinária Brasileira** 36:108-118

Pazzini JM, Serafim E, Gartner F, et al. (2017) Histochemical and Immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37: 1519-1525

Pedretti SLDaC, Rena C, De L, Castanon MC MN, et al. (2017) Effects of dimethylsulfoxide and pentoxifylline in the vitality of cutaneous flaps in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões** 44:457–464

Rodrigues HWS et al. (2018) Stereological and Morphometric Study of Type 3 Collagen Formation in the Cutaneous Wounds of Diabetic Mice Treated with Mesenchymal **Stem Cell Acta Scientiae Veterinariae** 46: 1-11

Travagli T, Zanardi G, Valacchi et al. (2010) Ozone and ozonated oil in skin disease: A review. **Mediators Inflammation**.

Valacchi et al. (2011) Ozonated sesame oil cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair and Regeneration**. 19: 107-115

Xiao W et al. (2017) Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3k/Akt/mTOR signaling pathway. **Bioscience Reports**

**APENDICE A – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA**

**Dia** \_\_\_\_\_ **Rato** \_\_\_\_\_ **Avaliador** \_\_\_\_\_

## 1. Exudato

( ) 1 ausência      ( ) 2 discreta      ( ) 3 moderada      ( ) 4 intensa

## 2. Edema

( ) 1 ausência      ( ) 2 discreta      ( ) 3 moderada      ( ) 4 intensa

## 3. Necrose

( ) 0 ausente      ( ) 1 presente

## 4. Coloração

( ) 1 pálido      ( ) 2 rosa      ( ) 3 hiperêmico      ( ) 4 enegrecido

## 5. Aspecto cosmético

( ) 1 excelente      ( ) 2 bom      ( ) 3 regular      ( ) 4 ruim



## APÊNDICE B – INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS MICROSCÓPICAS

### **Células mononucleares**

Ausente (0) quando não visualizadas no campo óptico

Discreta (1) quando evidenciadas de forma isolada, distinguindo áreas livres de infiltrado

Moderada (2) quando aparece com maior frequência, em agregados densos mas ainda diferenciando áreas livres de infiltrados

Acentuada (3) quando evidenciada em grande frequência, em agregados densos, sem áreas livres de infiltrados

### **Células polimorfonucleares**

Ausente (0) quando não visualizadas em campo óptico

Discreta (1) quando evidenciadas de forma isolada, e muitas áreas livres de infiltrados

Moderada (2) quando visualizadas formando agregados porém ainda com áreas adjacentes livres de infiltrados

Acentuada (3) quando aparecia células em grande frequência sem áreas livres de infiltrados

### **Re-epitelização**

Ausente (1) quando o epitélio não era visualizado no campo óptico

Discreto (2) ou moderado (2) quando aparecia de forma incompleta ou parcial

Acentuada (3) quando visualizada de forma completa ou total