

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA VIBRAÇÃO DE CORPO INTEIRO, ISOLADA OU
ASSOCIADA AO BAGGING DE OZÔNIO OU ÓLEO DE GIRASSOL
OZONIZADO, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
EM RATOS

GUSTAVO MANEA FERREIRA

Botucatu – SP
Outubro de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA VIBRAÇÃO DE CORPO INTEIRO, ISOLADA OU
ASSOCIADA AO BAGGING DE OZÔNIO OU ÓLEO DE GIRASSOL
OZONIZADO, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS
EM RATOS

GUSTAVO MANEA FERREIRA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos

Botucatu – SP
Outubro de 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ferreira, Gustavo Manea.

Avaliação da vibração de corpo inteiro, isolada ou associada ao bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos / Gustavo Manea Ferreira. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ivan Felismino Charas dos Santos

Capes: 50501070

1. Pele - Doenças. 2. Óleo de girassol. 3. Ozônio.
4. Traumatismo. 5. Vibração (Terapêutica).

Palavras-chave: Ozônio; Pele; Plataforma vibratória; Trauma; Vibração mecânica.

Nome do autor: Gustavo Manea Ferreira

Título: Avaliação da Vibração de Corpo Inteiro, isolada ou associada ao bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos
Orientador
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Titular Sheila Canevese Rahal
Membro
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim
Membro
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Botucatu

Data da defesa: 29 de outubro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Sou extremamente grato por tudo que aconteceu até este momento em minha vida. Os altos e baixos, os erros e acertos, tudo serve como aprendizado e mais sabedoria. Acredito que os momentos ruins são mais duros sim, porém são os que mais me fazem crescer, e por isso esse sentimento de gratidão é imenso e abrangente. O que sou hoje é o resultado desses momentos e pessoas que passaram em minha vida. Assim, agradeço a tudo que vivi que ajudou na minha decisão em seguir o caminho acadêmico e da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal pela oportunidade de realizar meu mestrado e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (Unesp, Botucatu), em especial à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) pelo suporte que oferece aos seus alunos.

Gratidão aos meus familiares, em especial, meus pais José e Sara que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões com respeito e amor, e ao meu irmão Gileade que sempre será meu pequeno caçula.

Sou grato ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos, pela oportunidade e por acreditar em mim, e pela dedicação extrema que tem com todos os seus orientados, buscando sempre o crescimento pessoal e profissional de cada um. À Profa. Sheila Canevese Rahal e ao Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim, por terem compartilhado conhecimentos e parcerias que agregaram no presente trabalho.

^c
Especial agradecimento à equipe do setor de Patologia Veterinária (FMVZ – Unesp, Botucatu), em especial à Profa. Noeme Sousa Rocha e seus residentes Alexandre Batazza e Felipe César da Silva Brasileiro, que auxiliaram na confecção e leitura das lâminas da avaliação histopatológica.

Agradeço, também, à Profa. Claudia Helena Pellizzon, Departamento de Morfologia (Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp) pela análise do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias, e ao Luiz Carlos Edevalter Bardella (Unidade de Pesquisa Experimental, UNIPEX, Unesp, Botucatu) pelo auxílio na realização da tensiometria das feridas. Ao Lucas Fernando Sérgio Gushiken pelas análises estatísticas, também por ser meu companheiro de república e ter toda a paciência do mundo. República essa que conheci pessoas sensacionais e sou privilegiado por isso.

Ao José Eduardo Cury Ramos, representante da empresa Ozontop - produtos ozonizados., agradeço a parceria por ter cedido o óleo de girassol ozonizado.

Aos meus amigos, sou extremamente grato pela parceria, companheirismo e apoio, principalmente pela ajuda na parte prática do estudo, em especial Marina Paiva Branco, Bruna Martins da Silva, José Ivaldo de Siqueira Silva Junior, David José de Castro Martins, Thais Hamae Sato, Gabriela Salewski, Bárbara Camargo, Bárbara Frezza e muitos outros.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE QUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1	1
1. Introdução e Justificativa	2
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. Pele	4
2.2. Cicatrização	4
2.2.1. Fases da cicatrização	5
2.3. Vibração de Corpo Inteiro.....	7
2.4. Ozonioterapia	9
2.4.1. Bagging do gás ozônio.....	10
2.4.2. Óleo ozonizado.....	11
3. Referências.....	12
CAPÍTULO 2	17
Trabalho científico	18
ANEXOS.....	35
Anexo 1.....	36
SÚMULA CURRICULAR.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] dos valores da massa corpórea (gramas) dos ratos dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 avaliados 24 horas antes da indução das feridas cutâneas (24hPRE), sete dias (7POS) e 14 dias após indução das feridas (14POS).....25

Quadro 2. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] dos valores da temperatura corpórea (°C) dos ratos dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 avaliados 24 horas antes da indução das feridas cutâneas (24hPRE), terceiro dia (3POS) e sétimo dia após indução das feridas (7POS), e dez dias (10POS) e 14 dias após indução das feridas (14POS).....25

Quadro 3. Evolução das feridas tratadas com solução salina (0,9%) (G1), feridas tratadas com solução salina (0,9%) e os ratos submetidos à VCI (G2), feridas tratadas com óleo de girassol ozonizado (G3), feridas tratadas com a solução salina (0,9%) e exposição direta do gás de ozônio (G4), feridas tratadas com solução salina (0,9%) e óleo de girassol ozonizado e os ratos submetidos à VCI (G5), feridas tratadas com solução salina (0,9%) e exposição direta do gás de ozônio e os ratos submetidos à VCI (G6) no sétimo dia após indução das feridas (7POS) e 14 dias após indução das feridas (14POS).....26

Quadro 4. Média e desvio padrão (DP) dos valores das áreas e contrações das feridas; força tensil máxima e deformidade máxima das feridas dos ratos dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 avaliados sete dias (7POS) e 14 dias após a indução das feridas (14POS).....27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plataforma vibratória (TheraPlate Revolution®) (92,0 x 62,0 x16,0 cm) (A). Tubos de PVC (22,0 cm de comprimento e 8,0 cm de diâmetro) (B). Tubos de PVC fixados com fita adesiva de polipropileno em cima da plataforma vibratória durante a submissão da VCI (C).....22
- Figura 2.** Teste de resistência tensil da ferida utilizando equipamento de força tensil (EMiC®).....24
- Figura 3.** Lesão histológica das feridas tratadas com solução salina (0,9%) e óleo de girassol ozonizado e os ratos submetidos à VCI (G5) (A) e feridas tratadas com solução salina (0,9%) e exposição direta do gás de ozônio e os ratos submetidos à VCI (G6) (B), sete dias (7POS) (A) e 14 dias após indução das feridas (14POS) (B) evidenciando infiltrado inflamatório polimorfonucleares (neutrófilos) (setas pretas), macrófago (seta vermelha), infiltrado mononuclear (setas azuis), neovascularização (setas brancas) e camadas dérmicas (estrelas pretas) [H&E].....28

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCDP	Fator de crescimento derivado de plaquetas
FCEV	Fator de crescimento endotelial vascular
FCF2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FCT- β	Fator de crescimento transformador beta
FNT- α	Fator de necrose tumoral alfa
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Hz	Hertz
IBB	Instituto de Biociências
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
LOP	Lipidioperóxidos
PV	Plataforma vibratória
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental
VCI	Vibração de Corpo Inteiro
%	Porcentagem

FERREIRA, G. M. Avaliação da Vibração de Corpo Inteiro, isolada ou associada ao bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Botucatu, 2020. 49p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO: O estudo teve como objetivo avaliar a Vibração de Corpo Inteiro (VCI), isolada ou associada ao Bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Foram utilizados 96 ratos Wistar hígdos com 14 semanas de idade, e massa corpórea entre 365 e 370 gramas. Feridas de 3 cm de diâmetro foram realizadas na região dorsal sob anestesia. Os ratos foram divididos por sorteio randomizado em seis grupos de 16 animais, de acordo com o tratamento da ferida e uso ou não da VCI: Grupo 1 – solução salina (0,9%); Grupo 2 – ratos submetidos à VCI; Grupo 3 (G3) – óleo de girassol ozonizado; Grupo 4 – bagging do gás de ozônio; Grupo 5 – óleo de girassol ozonizado e VCI; Grupo 6 - bagging do gás de ozônio e VCI. As variáveis analisadas incluíram: avaliação clínica, tensiométrica e histológica; e mensuração das feridas. Foi identificada uma diminuição significativa das áreas das feridas e aumento significativo da contração das feridas em todos os grupos, com menor área e maior contração nas feridas do G6. Foi evidenciado aumento significativo somente na força tensil do grupo G5. Diferenças significativas estiveram presentes no sétimo dia de tratamento em relação à intensidade do infiltrado inflamatório intenso (neutrófilos) no G1, e intensidade leve (neutrófilos e macrófagos) nos grupos G2, G4 e G6. A associação da VCI e bagging do gás ozônio ou óleo de girassol ozonizado foi mais efetivo em relação ao tratamento isolado na cicatrização de feridas cutâneas de ratos hígdos.

Palavras-chave: pele, plataforma vibratória, ozônio, trauma, vibração mecânica.

FERREIRA, G. M. Evaluation of Whole-Body Vibration, alone or associated with ozone bagging or ozonated sunflower oil in cutaneous wound healing in rats. Botucatu, 2020. 49p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the Whole-Body Vibration (WBV), isolated or associated with ozone Bagging or ozonated sunflower oil, in the healing of skin wounds in rats. Ninety-six healthy Wistar rats aging of 14 weeks and weighing between 365 and 370 grams. Wounds of 3 cm in diameter were performed on the dorsal region under anesthesia. The rats were divided by random drawing into six groups of 16 animals, according to the treatment of the wound and the use or not of WBV: Group 1 - saline solution (0.9%); Group 2 - rats submitted to WBV; Group 3 (G3) - ozonized sunflower oil; Group 4 - ozone bagging; Group 5 - ozonated sunflower oil and WBV; Group 6 - ozone bagging and WBV. The analyzed variables included: clinical, tensiometric and histological evaluation; and measurement of wounds. Significant decrease in wound areas and significant increase in wound contraction were identified in all groups, with a smaller area and greater contraction in the wounds of G6. Significant increase in tensile strength was observed only in G5, and statical differences were present on the 7th day of treatment in relation to the intense inflammatory infiltrate (neutrophils) in G1, and mild intensity (neutrophils and macrophages) in groups G2, G4 and G6. The association of WBV and ozone bagging or ozonated sunflower oil was more effective in relation to the isolated treatment in the healing of cutaneous wounds of healthy rats.

Keywords: skin, vibrating platform, ozone, trauma, mechanical vibration.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cicatrização é um conjunto de eventos celulares coordenados e dinâmicos que tem por objetivo restituir o tecido lesionado na sua forma funcional e morfológica, sendo dividido em três fases principais: inflamação, proliferação e remodelação (OLIVEIRA e DIAS, 2012). O processo cicatricial pode ocorrer de forma fisiológica sem o uso de produtos ou equipamentos que acelerem a cicatrização, porém quando a ferida é tratada ocorre uma cicatrização de forma mais rápida, sem prejuízo na qualidade do tecido cicatricial final, evitando-se contaminações e infecções (ROCHA e REIS, 2005; MÖRSCHBÄCHER et al., 2011).

Atualmente, várias terapias integrativas e alternativas são estudadas na área da cicatrização, como alternativas economicamente viáveis, menos invasivas, com efeitos colaterais mínimos e com ausência de contaminação ambiental com seus resíduos (MALAGUTTI e KAKIHARA, 2010; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Os protocolos de tratamento de feridas cutâneas baseadas em energia mecânica local, como a laserterapia, terapia com ultrassom, terapia por vibração, entre outras, são frequentemente utilizadas no intuito de modificar o ambiente celular e bioquímico e, conseqüentemente, estimular a angiogênese e formação do tecido de granulação (ENNIS et al., 2008; WEINHEIMER-HAUS et al., 2014; YU et al., 2017). A Vibração de Corpo Inteiro (VCI) é um estímulo mecânico vibratório gerado por plataformas vibratórias (PV), que se difunde por todo corpo de forma uniforme e sincronizada, sendo utilizada no tratamento de diversas afecções em pacientes humanos (RITTWEGGER, 2010; COCHRANE, 2011), e na cicatrização de feridas (ARASHI et al., 2010; MAHRAN et al., 2013; WEINHEIMER-HAUS et al., 2014; SARI et al., 2015; YU et al., 2017).

Por sua vez, a ozonioterapia é uma terapia integrativa que induz um estresse oxidativo suficiente para desencadear uma ação antioxidante fisiológica pelo organismo, e fornece maior quantidade de oxigênio para os tecidos (BOCCI, 2011). Ela tem-se demonstrado eficiente no tratamento de feridas extensas e de difícil cicatrização, sendo de baixo custo e com efeitos colaterais mínimos (BOCCI, 2007).

Estudos relacionados com o uso da VCI, isolada ou associada com a ozonioterapia na cicatrização de feridas não contaminadas em animais hígidos estão ausentes na literatura. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ação cicatrizante da VCI, isolada ou associada ao Bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas, utilizando o rato Wistar hígido como modelo experimental de curta duração. A hipótese é que a associação da terapia de vibração e ozonioterapia tópica seja mais benéfica na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar em relação à solução salina (0,9%) e a terapia de vibração e ozonioterapia isoladas.

O estudo se justificou visto não existirem até o momento referência na literatura sobre o uso da VCI e da ozonioterapia, isolados ou associados, na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas de ratos hígidos, e assim justificando o seu ineditismo. Por outro lado, as terapias que usam vibração mecânica e o gás ozônio possuem baixo custo, efeitos colaterais mínimos, e ausência de descarte de resíduos favorecendo à sustentabilidade ambiental.

A presente dissertação gerou dois artigos científicos intitulados:

1. Avaliação da Vibração de Corpo Inteiro, isolada ou associada ao Bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos;
2. Avaliação do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em feridas cutâneas de ratos tratadas com Vibração de Corpo Inteiro, isolada ou associada ao Bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado.

O primeiro artigo será enviado de imediato, e o segundo após determinação laboratorial da atividade oxidativa e inflamatória.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Pele

A pele é o maior órgão dos mamíferos, e atua na proteção contra estímulos externos deletérios para o organismo, tornando sua capacidade de reparo essencial para a manutenção da vida (OLIVEIRA e DIAS, 2012; SZWED e SANTOS, 2015).

Ela é constituída por epitélio superficial ou epiderme, derme e hipoderme (tecido adiposo subcutâneo) (PIRIS e LIMA, 2014). A epiderme é uma estrutura dinâmica e formada por um epitélio escamoso estratificado que se desenvolve do ectoderma do embrião, e o seu tecido conjuntivo deriva de tecido conjuntivo frouxo embrionário indiferenciado (PIRIS e LIMA, 2014). As principais funções incluem: proteção contra agressões externas e desidratação; e excreção de toxinas (LIMONTA et al., 2017). A derme localiza-se na região mais profunda da pele, sendo formada pela camada papilar superficial e reticular profunda (PIRIS e LIMA, 2014). Na camada papilar estão presentes as terminações nervosas, receptores sensoriais, fibroblastos e fibrócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos e mastócitos (PIRIS e LIMA, 2014; LIMONTA et al., 2017). Por sua vez, a camada reticular é formada por feixes de fibras colágenas, tecido conectivo denso com vasos sanguíneos, folículos pilosos, nervos, glândulas sebáceas e sudoríparas (LIMONTA et al., 2017). Finalizando, a hipoderme tem na sua composição o tecido conjuntivo frouxo e adiposo (PIRIS e LIMA, 2014; LIMONTA et al., 2017).

2.2. Cicatrização

O objetivo final da reparação de uma ferida está inserido na restauração da função e estrutura normal da pele ou mucosa após um trauma, na qual as células se dividem e migram, sendo iniciado por meio da ação de fatores de crescimento (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Essa reparação ocorre por regeneração e por cicatrização, que depende do tipo de tecido traumatizado e do grau desse trauma (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Na regeneração ocorre substituição do tecido lesado pelo mesmo

tipo de tecido, enquanto que na cicatrização ocorre propagação de tecido conectivo fibroso (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

A cicatrização de feridas é definida como sendo um processo íntegro e complexo, que consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, bioquímicos e moleculares que interagem entre si para que ocorra a reconstituição do tecido lesionado (OLIVEIRA e DIAS, 2012). Ela classifica-se em três fases: fase inflamatória, proliferativa e de remodelação (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

2.2.1. Fases da cicatrização

Após a lesão tecidual, ocorre a laceração dos vasos e o extravasamento dos elementos sanguíneos, fazendo com que haja contato com as substâncias da matriz extracelular e liberação dos mediadores vasoativos, promovendo vasoconstrição imediata (CAMPOS et al., 2007; MENDONÇA e NETTO, 2009; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Após a vasoconstrição ocorre a migração das plaquetas para região lesionada e consequentemente hemostasia (CAMPOS et al., 2007). Essas plaquetas liberam fatores de crescimento, citocinas e elementos da matriz extracelular, para composição do coágulo, protegendo de agentes exógenos que possam penetrar na lesão, como também evitando a perda de sangue e fluídos para o meio extravascular (MENDONÇA e NETTO, 2009).

Fase inflamatória

A fase inflamatória é caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, migração celular e mediadores inflamatórios para à lesão, produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (OLIVEIRA e DIAS, 2012). Esse grupo celular inclui os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e os macrófagos derivados dos monócitos (MENDONÇA e NETTO, 2009; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Nas primeiras 24 e 48 horas os neutrófilos são significativamente predominantes na ferida e são responsáveis pela fagocitose de bactérias, de corpos estranhos e de fragmentos celulares; preparam a ferida para a fase proliferativa visto que são fonte de

mediadores bioquímicos e de fatores de crescimento; e persistem na lesão por cerca de três dias após o trauma (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Por outro lado, os monócitos transformam-se em macrófagos 24 a 48 horas após a lesão, e entre o terceiro e quinto dia, ocorre a liberação da colagenase (MENDONÇA e NETTO, 2009). As funções dos macrófagos incluem: remoção do tecido necrótico, de agentes infecciosos e de fragmentos que possam atrasar a cicatrização; indução da liberação de citocinas [interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), e Interferon gama (IFN- γ)] e do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FCF2) e transformador beta (FCT- β) (OLIVEIRA e DIAS, 2012). As citocinas e os fatores de crescimento coordenam a formação do tecido de granulação, angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, dando início a fase proliferativa (MENDONÇA e NETTO, 2009; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Na fase precoce da cicatrização ocorre deposição de fibronectina e ácido hialurônico, desencadeando um ambiente favorável para a propagação celular, e com o avanço do processo ocorre modificação para proteoglicanos (BALBINO et al., 2005). A ação antimicrobiana da fase inflamatória é garantida pelos neutrófilos, por meio da produção de radicais livres de oxigênio, e pelos macrófagos por meio do aumento da síntese de óxido nítrico, que reage com peróxidos gerando um agente muito mais potente que o primeiro (BALBINO et al., 2005).

Fase proliferativa

Esta fase inicia-se em média no quarto dia após a lesão, podendo durar até 15 dias (BALBINO et al., 2005; CAMPOS et al., 2007). Ela é caracterizada por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (BALBINO et al., 2005; OLIVEIRA e DIAS, 2012). A epitelização inicia-se após a lesão, sendo caracterizada pela movimentação das células epiteliais da margem e do centro da ferida, com duração em média de três dias (BALBINO et al., 2005; CAMPOS et al., 2007). A angiogênese é estimulada pela presença do FNT- α e do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) sobre as células endoteliais dos vasos, e pela baixa tensão de oxigênio que ocorre no centro da ferida (BALBINO et al., 2005). Os componentes da matriz extracelular são organizados para que ocorra

a migração de células endoteliais e formação de novos capilares (BALBINO et al., 2005). A formação de novos vasos sanguíneos é essencial para dar início a formação tecido de granulação, que é formado por fibroblastos, estes produzem a fibronectina e o colágeno, e por células endoteliais (BALBINO et al., 2005; CAMPOS et al., 2007; MENDONÇA e NETTO, 2009). Por sua vez, os fibroblastos são ativados pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e a produção do colágeno tipo I e sua transformação em miofibroblastos é estimulada pelo FCT- β colágeno tipo I (BALBINO et al., 2005; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Os miofibroblastos promovem a contração da ferida, dando início a fase de remodelação (BALBINO et al., 2005).

Fase remodelativa

A fase de remodelação, ou de maturação, pode durar até 12 meses e finaliza o processo cicatricial da ferida, sendo caracterizada pela degradação do colágeno tipo III, presente em maior quantidade no tecido de granulação, para dar origem ao colágeno tipo I, que inicialmente é um colágeno mais fino, e com o tempo é reabsorvido e substituído por um colágeno mais espesso (OLIVEIRA e DIAS, 2012). Durante esta fase ocorre reorganização das fibras colágenas de forma aleatória, para uma organização em linha, e regressão endotelial por meio da diminuição progressiva da neovascularização (BALBINO et al., 2005). Doze meses após a lesão é identificado um colágeno menos organizado em relação à pele integra, diminuição da quantidade dos fibroblastos e dos elementos do tecido conjuntivo (CAMPOS et al., 2007).

2.3. Vibração de Corpo Inteiro

A Vibração de Corpo Inteiro (VCI) é definida como sendo estímulos vibratórios sincronizados que se propagam por todo corpo, e gerados por plataformas vibratórias (PV) (COCHRANE, 2011). Além de ser usada na fisioterapia e/ou reabilitação de pacientes humanos com afecções articulares, e entre outros (COCHRANE, 2011; RITTWEGGER, 2010), a VCI foi utilizada na cicatrização de feridas de pacientes humanos e ratos diabéticos (ARASHI et al., 2010; MAHRAN et al., 2013; WEINHEIMER-HAUS et al., 2014; YU et al. 2017), e em feridas profundas de ratos hígidos (SARI et al., 2015). Além disso, outros

estudos demonstraram aumento do fluxo sanguíneo da pele devido à VCI em pacientes humanos (LOHMAN et al., 2007; MALONEY-HINDS et al., 2008; JOHNSON et al., 2014).

Na Medicina Veterinária, a VCI foi usada no tratamento de metrite purulenta em cadela (SANTOS et al., 2017b). Paralelamente, estudos dos efeitos da vibração mecânica foram realizados em pinguins (SANTOS et al., 2016), cavalos e bovinos (CARSTANJEN et al., 2010; CARSTANJEN et al., 2013; HALSBERGHE et al., 2016; HALSBERGHE et al., 2017) e em cães (FREIRE et al., 2015; SANTOS et al., 2017a; GOMES et al., 2018; SANTOS et al., 2019; NAGAI et al., 2020).

No estudo realizado por Mahran et al. (2013) identificaram melhora na cicatrização de úlcera do pé em pacientes humanos diabéticos tipo 2, submetidos à três sessões diárias de 15 minutos de VCI (47 Hz) durante 30 dias. Essa melhora foi associada ao aumento do suprimento sanguíneo na região pela vasodilatação induzida pela terapia por vibração. Griffin et al. (2006) referenciaram que a vasodilatação induzida pela VCI está associada às tensões mecânicas de compressão e alongamento das células endoteliais devido a mecanotransdução, sendo regulada principalmente pelo óxido nítrico, considerado um potente vasodilatador. Por outro lado, Caselli et al. (2006) relacionaram a vasodilatação com o reflexo axonal vasodilatador microvascular que ocorre quando um tecido é lesado, e a vibração pode induzir impulsos via receptores distribuídos na superfície da pele, resultando na liberação da substância P e calcitonina que possuem propriedades vasodilatadoras.

Por sua vez, Weinheimer-Haus et al. (2014) realizaram um estudo com feridas cutâneas de ratos diabéticos submetidos à sessões diárias de baixa intensidade de VCI (45 Hz, 30 minutos), durante 14 dias. Os autores identificaram uma diminuição significativa de neutrófilos e de neovascularização, e um aumento significativo de macrófagos nas feridas dos ratos submetidos à VCI, sete e 15 dias após a indução das feridas. Esses resultados foram associados com o aumento dos fatores de crescimento e quimiocinas (fator de crescimento semelhante à insulina-1, FCEV e proteína quimiotática-1 de monócitos), determinando um efeito anabólico da vibração mecânica na cicatrização de feridas com a aceleração da fase proliferativa.

Com relação às feridas não contaminadas foi identificada uma ação da VCI (sessões diárias de 15 minutos com 47 Hz durante 14 dias) por meio da desregulação da matriz fator-1 induzível por hipóxia do eixo da metaloproteinase em feridas profundas de ratos hígidos (SARI et al., 2015).

Efeitos indesejados associados à terapia por vibração em pacientes humanos foram relatados pela literatura. Jordan et al. (2005) referenciaram hemorragia vítrea espontânea em paciente humano duas semanas após a sessão única de 20 minutos de VCI. Monteleone et al. (2007) identificaram nefrolitíase assintomática e hidronefrose em corredora amadora 12 horas após sessão de cinco minutos de terapia vibracional. Por sua vez, Franchignoni et al. (2013) reportaram hematúria em corredor de elite após o treinamento com VCI (30 Hz) com protocolo de cinco repetições de um minuto. Porém, em todos os casos os sintomas clínicos desapareceram após o término do estímulo vibratório.

2.4. Ozonioterapia

O gás ozônio foi descoberto no início do século XIX e caracterizado por ser uma substância incolor e com odor acre e formada por três átomos de oxigênio em uma estrutura dinamicamente instável (Di PAOLO et al., 2004). É considerado um gás reativo e tóxico, principalmente no sistema respiratório e nos olhos (Di PAOLO et al., 2004; BOCCI, 2007). Contudo, em condições controladas pode ser terapêutico visto que desencadeia uma cascata de compostos químicos que atuam em múltiplos alvos celulares (Di PAOLO et al., 2004; BOCCI, 2007; BOCCI, 2011).

Para o uso clínico do gás ozônio existem diversos tipos de geradores do gás, nos quais a variação de voltagem permite fornecer a quantidade necessária de energia para promover a reação de dissociação dos átomos de oxigênio puro em duas moléculas de oxigênio, de modo que as mesmas reajam com outras moléculas de oxigênio e formem o composto desejado com uma concentração específica (Di PAOLO et al., 2004; SANCHEZ, 2008; BOCCI, 2011).

O gás ozônio ao entrar em contato com fluidos orgânicos interage com as substâncias presentes no local que atuam como doadores de elétrons e sofrem oxidação, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio

(EROs) e lipidioperóxidos (LOPs), responsáveis por desencadear as reações bioquímicas subsequentes (Di PAOLO et al., 2004; BOCCI, 2011). As EROs são instáveis, com meia vida menor que os LOPs, mas capazes de interagir com componentes celulares apresentando efeitos terapêuticos benéficos ou prejudiciais, de acordo com a concentração (Di PAOLO et al., 2004; BOCCI, 2007; BOCCI, 2011).

A ozonioterapia é usada em pacientes humanos para tratar afecções infecciosas e isquêmicas, osteoartrose, cicatrização de feridas extensas, entre outros (BOCCI, 2007). Para o uso terapêutico é realizado uma mistura de ozônio e oxigênio com limite de 5% de ozônio e 95% de oxigênio (Di PAOLO et al., 2004), variando a sua quantidade e concentração de acordo com a afecção e via de administração (BOCCI, 2007; BOCCI, 2011). Pela sua versatilidade, o gás ozônio pode ser administrado por diferentes vias: auto-hemoterapia, insuflação retal, via intraperitoneal, exposição direta em lesões cutâneas, aplicação tópica de óleos vegetais (girassol, jojoba e azeite) ozonizados, via intra-articular, via intramuscular, via subcutânea, via miofacial, entre outras (Di PAOLO et al., 2004).

O mecanismo de ação no processo cicatricial está associado com a aceleração da fase proliferativa e de remodelação, pela oxigenação dos tecidos e aumento do aporte de oxigênio (BOCCI, 2011). Contudo, os efeitos tóxicos estão associados com a via e velocidade de administração; volume e concentração; e uso de materiais de látex (Di PAOLO et al., 2004, BOCCI, 2007). Essa terapia é contraindicada em gestantes; pacientes com hipotireoidismo e trombocitopenia; e pacientes cardiopatas (BOCCI, 2007).

2.4.1. Bagging de gás ozônio

A técnica do bagging consiste no uso de um saco hermeticamente fechado onde o gás ozônio é inserido em altas concentrações, entrando em contato direto com o leito da ferida a ser tratada ou diretamente com a pele, na forma de gás (Di PAOLO et al., 2004; BOCCI, 2007; BOCCI, 2011).

Franco et al. (2019) realizaram um estudo sistemático entre os anos de 2005 a 2015 sobre o uso do gás ozônio no tratamento de feridas cutâneas em pacientes humanos. Os autores identificaram 118 artigos, dos quais quatro foram inclusos no estudo, sendo que a maioria dos artigos analisados se referiu

a aplicação do gás ozônio em úlceras de pé diabético, demonstrando melhorias na cicatrização.

2.4.2. Óleo ozonizado

O gás ozônio pode ser incorporado em diferentes veículos que possuam ação cicatrizante, como os óleos vegetais (Di PAOLO et al., 2004). O óleo de girassol é considerado um dos melhores veículos por ter maior concentração de substâncias que agem na cicatrização, como: ácidos graxos essenciais (ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico); além de possuir vitaminas A e E (Di PAOLO et al., 2004; BOCCI, 2007).

Sanchez (2008) utilizou o óleo de girassol ozonizado a cada 12 horas no tratamento de ferida incisiva traumática em porquinho da índia (*Cavia porcellus*), e evidenciou oclusão da ferida oito dias após o início do tratamento. Estudo realizado por Valacchi et al. (2011) avaliou os efeitos terapêuticos de três graus diferentes de óleo de gergelim ozonizado em feridas cutâneas de camundongos durante 14 dias. Os autores observaram que as feridas tratadas com o óleo de gergelim moderadamente ozonizado possuíram uma taxa de oclusão mais rápida nos primeiros sete dias, com maior resposta das células envolvidas no reparo de feridas, maior angiogênese, bem como um aumento dos fatores de crescimento endotelial vascular e expressão da ciclina D1.

3 REFERÊNCIAS

ARASHI, M.; SUGAMA, J.; SANADA, H.; KONYA, C.; OKUWA, M.; NAKAGAMI, G. Vibration therapy accelerates healing of stage I pressure ulcers in older adult patients. **Advance Skin Wound Care**, v.23, p.321–327, 2010.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BOCCI, C. The case for oxygen-ozone therapy. **British Journal of Biomedical Science**, v.64, n.1, p.44-48, 2007.

BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medical Gas Research**, v.1, n.1, p.62-9, 2011.

CAMPOS, A. C. L.; BRANCO, A. B.; GROTH, A. K. Cicatrização De Feridas. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**. Artigo de revisão, v. 20, n. 1, p. 51-8, 2007.

CARSTANJEN, B.; PENNECKE, J.; BOEHART, S.; MÜLLER, K. E. Unilateral Polydactylism in a German Holstein-Friesian Calf - A case report. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, n.1, p. 69-74, 2010.

CARSTANJEN, B.; BALALI, M.; GAJEWSKI, Z. Short-term Whole-body vibration exercise in adult healthy horses. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 16, n. 2, p. 403-405, 2013.

CASELLI, A.; SPALLONE, V.; MARFIA, G.A.; BATTISTA, C.; PACHATZ, C.; VEVES, A.; UCCIOLI, L. Validation of the nerve axon reflex for the assessment of small nerve fibre dysfunction. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v.77, n.8, p.927-932, 2006.

COCHRANE, D. J. Vibration exercise: The potential benefits. **International Journal of Sports Medicine**, v.32, n.2, p.75-99, 2011.

DI PAOLO, N.; BOCCI, V.; GAGGIOTTI, E. Ozone therapy. **International Journal of Artificial Organs**, v.27, n.3, p.168-175, 2004.

ENNIS, W. J. MENESES, P.; BORHANI, M. Push-pull theory: using mechanotransduction to achieve tissue perfusion and wound healing in complex cases. **Gynecologic oncology**, v.111, n.2, p.81-86, 2008.

FRANCO, D. F. R.; BEZERRA, S. R. S.; Da SILVA, T. G. M.; MARTINS, C. C. Uso terapêutico do ozônio no tratamento de lesões cutâneas. **Unifunec Ciências da Saúde e Biologia**, v.3, n.5, p.1-10, 2019.

FREIRE, L.; RAHAL, S. C.; SANTOS, I. F. C.; TEIXEIRA, C. R.; INAMASSU, L. R.; MAMPRIM, M. J. Renal resistive index of adult healthy dogs submitted to short-term whole-body vibration exercise. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.10, p.797-802, 2015.

GRIFFIN, M. J.; WELSH, A. J.; BOVENZI, M. Acute response of finger circulation to force and vibration applied to the palm of the hand. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v.32, p.383-391, 2006.

HALSBERGHE, B. T.; GORDON-ROSS, P.; PETERSON, R. Whole body vibration affects the cross-sectional area and symmetry of the m. multifidus of the thoracolumbar spine in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.29, n.9, p.493-499, 2017.

JOHNSON, P. K.; FELAND, J. B.; JOHNSON, A. W.; MACK, G. W.; MITCHELL, U. H. Effect of Whole-body vibration on skin blood flow and nitric oxide production. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v.8, n.4, p.889-894, 2014.

JORDAN, M. J.; NORRIS, S. R.; SMITH, D. J.; HERZOG, W. Vibration Training: an overview of the area, training consequences, and future considerations. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v.19, p.459-466, 2005.

LIMONTA, A. N.; RIBEIRO, V. S.; GOMES, J. P. C.; MORAES, C. A. P. Criolipólise: A importância da membrana anticongelante na prevenção de queimaduras. **InterfacEHS**, v. 12, n. 1, p. 312 – 318, 2017.

LOHMAN, E. B.; PETROFSKY, J. S.; MALONEY-HINDS, C.; BETTS-SCHWAB, H.; THORPE, D. The effect of Whole-body vibration on lower extremity skin blood flow in normal subjects. **Medical Science Monitor**, v.13, p.71–76, 2007.

MAHRAN, H. G.; HELAL, O. F.; FIKY, A. A. R. Effect of Mechanical Vibration Therapy on Healing of Foot Ulcer in Diabetic Polyneuropathy Patients. **Journal of American Science**, v.9, n.7, p.76-87, 2013.

MALAGUTTI, W.; KAKIHARA, C. T. Curativos, estomias e dermatologia: uma abordagem multiprofissional. **São Paulo: Martinari. Enfermería Global**, v.9, n.2, p.211, 2010.

MALONEY-HINDS, C.; PETROFSKY, J. S.; ZIMMERMAN, G. The effect of 30 Hz vs 50 Hz passive vibration and duration of vibration on skin blood flow in the arm. **Medical Science Monitor**, v.14, p.112–116, 2008.

MENDONÇA, R. J.; NETTO, J. C. Aspectos celulares da cicatrização/ Cellular aspects of wound healing. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.257-62, 2009.

MONTELEONE, G.; De LORENZO, A.; SGROI, M.; De ANGELIS, S.; Di RENZO, L. Contraindications for whole body vibration training: a case of nephrolithiasis. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.47, p.443-445, 2007.

MÖRSCHBÄCHER, P. D.; LAMBERTS, M.; TUANE, N. A. G.; EMERSON, A. C. Uso de membrana biológica de hemicelulose (VELODERM) e pomada de calêndula (*Calendula officinalis*) como adjuvante na cicatrização músculo-cutânea em um cão. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.3, p.366-370, 2011.

NAGAI, L. R. RAHAL, S. C.; DADALTO, C.; SILVA, B. M.; TSUNEMI, M.; MAMPRIM, M. J.; GALLINA, M. F.; NAGAMO, Y. F.; LOPES, S. H. S.; SANTOS, I. F. C. Acute Effects of Whole-Body Vibration on Dopplerfluxometry of the Common Carotid Artery Parameters among Adult and Elderly Non-Athletes Healthy Dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.48, p. e1764, 2020.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização De Feridas: Fases e fatores de Influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

PIRIZ, M. A.; LIMA, C. A. B. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n.3, p. 628-636, 2014.

RITTWEGGER, J. Vibration as an exercise modality: how it may work, and what its potential might be?. **European Journal of Applied Physiology**, v.108, p.877–904, 2010.

SANCHEZ, C. M. S. A utilização de óleo ozonizado para o tratamento tópico de lesões em porquinho da índia (*Cavia porcellus*) – relato de caso. **Monografia (Pós-Graduação em Clínica Médica e Cirúrgica e Animais Selvagens) – Universidade Camilo Castelo Branco: Itatiba**. p.38, 2008.

SANTOS, I. F. C.; RAHAL, S. C.; SHIMONO, J.; TSUNEMI, M.; TAKAHIRA, R.; TEIXEIRA, C. R. Whole-body vibration exercise on hematology and serum biochemistry in healthy dogs. **Journal Topics in Companion Animal Medicine**. v.32, p.86–90, 2017a.

SANTOS, I. F. C.; RAHAL, S. C.; FREIRE, L.; TEIXEIRA, C. R.; INAMASSU, L. R.; MAMPRIM, M. J.; GOMES, M. V. F.; TANNUS, F. C. I. Acute effect of whole-body vibration in a female dog with metritis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.45, p.185, 2017b.

SANTOS, I. F. C.; RAHAL, S. C.; SANTOS, A.; INAMASSU, L.; RODRIGUES, M.; TSUNEMI, M.; MAMPRIM, M. J.; RODRIGUES, C.; TEIXEIRA, C.; SATO, T. Whole-body vibration on leg muscles thermography and femoral resistive index of in adult healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v.122, p.118-123, 2019.

SARI, Y.; SANADA, H.; MINEMATSU, T.; NAKAGAMI, G.; NAGASE, T.; HUANG, L.; NOGUCHI, H.; MOR, T.; YOSHIMURA, K.; SUGAMA. Vibration inhibits deterioration in rat deep-tissue injury through HIF1–MMP axis. **Wound Repair and Regeneration**, v.23, n.3, p.386-93, 2015.

SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. D. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, p. 123 – 131, 2015.

VALACCHI, G.; LIM, Y.; BELMONTE, G.; MIRACCO, C.; ZANARDI, I.; BOCCI, V.; TRAVAGLI V. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair and Regeneration**, v.19, p.107–115, 2011.

WEINHEIMER-HAUS, E. M.; JUDEX, S.; ENNIS, W. J.; KOH, T. J. Low-intensity vibration improves angiogenesis and wound healing in diabetic mice. **PLOS ONE**, v.9, n.3, p.1-8, 2014.

YU, C. O. L.; LEUNG, K.; JIANG, J. L.; WANG, T. B.; CHOW, S. K.; CHEUNG, W. Low-magnitude high-frequency vibration accelerated the foot wound healing of n5- streptozotocin-induced diabetic rats by enhancing glucose transporter 4 and blood microcirculation. **Scientific Reports**, v.7, p. e11631, 2017.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo científico a ser enviado para a PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Normas: [http:// www.pvb.com.br/portal/normas](http://www.pvb.com.br/portal/normas)

O presente trabalho científico será traduzido para a língua inglesa para submissão. O corpo do texto foi formatado de acordo com as normas de submissão da revista, com exceção das figuras e legendas que estão inseridas no texto para facilitar a leitura.

VIBRAÇÃO DE CORPO INTEIRO, ISOLADA OU ASSOCIADA AO BAGGING DO GÁS OZÔNIO OU ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS

RESUMO.- [Vibração de corpo inteiro, isolada ou associada ao bagging do gás ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.]. O estudo teve como objetivo avaliar a Vibração de Corpo Inteiro (VCI), isolada ou associada ao bagging do gás ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Foram utilizados 96 ratos Wistar hígidos com 14 semanas de idade, e massa corpórea entre 365 e 370 gramas. Feridas de 3 cm de diâmetro foram realizadas na região dorsal sob anestesia. Os ratos foram divididos por sorteio randomizado em seis grupos de 16 animais, de acordo com o tratamento da ferida e uso ou não da VCI: Grupo 1 – solução salina (0,9%); Grupo 2 – ratos submetidos à VCI; Grupo 3 (G3) – óleo de girassol ozonizado; Grupo 4 – bagging do gás de ozônio; Grupo 5 – óleo de girassol ozonizado e VCI; Grupo 6 – bagging do gás de ozônio e VCI. As variáveis analisadas incluíram: avaliação clínica, tensiométrica e histológica; e mensuração das feridas. Foi identificada uma diminuição significativa das áreas das feridas e aumento significativo da contração das feridas em todos os grupos, com menor área e maior contração nas feridas do G6. Foi evidenciado aumento significativo somente na força tensil do grupo G5. Diferenças significativas estiveram presentes no sétimo dia de tratamento em relação à intensidade do infiltrado inflamatório intenso (neutrófilos) no G1, e intensidade leve (neutrófilos e macrófagos) nos grupos G2, G4 e G6. A associação da VCI e bagging do gás ozônio ou óleo de girassol ozonizado foi mais efetivo em relação ao tratamento isolado na cicatrização de feridas cutâneas de ratos hígidos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: pele, plataforma vibratória, ozônio, trauma, vibração mecânica.

INTRODUÇÃO

A cicatrização é um conjunto de eventos celulares coordenados e dinâmicos que tem como objetivo restituir o tecido lesionado, sendo dividido em três fases principais: inflamação, proliferação e remodelação (Oliveira & Dias 2012). Ela pode ocorrer de forma fisiológica, sem o uso de produtos ou equipamentos que acelerem a cicatrização, porém quando é tratada, o processo cicatricial ocorre de forma mais rápida sem interferir na qualidade do tecido cicatricial final e com melhores resultados estéticos (Rocha & Reis 2005, Mörschbacher et al. 2011).

Atualmente, vários equipamentos e produtos são estudados área da cicatrização como alternativas economicamente viáveis, menos invasivas, efeitos colaterais mínimos e ausência de contaminação ambiental com seus resíduos (Malagutti & Kakihara 2010, Oliveira & Dias 2012). Os protocolos de tratamento de feridas cutâneas baseadas em energia mecânica local, como a laserterapia, terapia com ultrassom, vibração mecânica, entre outras, são frequentemente utilizadas no intuito de modificar o ambiente celular e bioquímico e, conseqüentemente, estimular a angiogênese e formação do tecido de granulação (Ennis et al. 2008, Weinheimer-Haus et al. 2014, Yu et al. 2017).

A Vibração de Corpo Inteiro (VCI) é um estímulo mecânico gerado por plataformas vibratórias (PV) e que se difunde por todo corpo de forma uniforme e sincronizada, e é utilizada no tratamento de diversas afecções em pacientes humanos (Rittweger 2010, Cochrane 2011), e na cicatrização de feridas (Arashi et al. 2010, Mahran et al. 2013, Weinheimer-Haus et al. 2014, Sari et al. 2015, Yu et al. 2017).

O efeito cicatrizante induzido pela VCI foi associado com aumento do suprimento sanguíneo na ferida devido à vasodilatação induzida pelo processo de mecanotransdução pelas tensões mecânicas de compressão e alongamento das células endoteliais (Griffin et al. 2006, Mahran et al. 2013). Contudo, Caselli et al. (2006) relacionaram essa vasodilatação com o reflexo axonal vasodilatador microvascular que ocorre quando um tecido é submetido à vibração mecânica, e desse modo induz impulsos via receptores distribuídos na superfície da pele, resultando na liberação da substância P e calcitonina que dilatam os vasos sanguíneos.

Por sua vez, a ozonioterapia é uma terapia que induz um estresse oxidativo suficiente para desencadear uma ação antioxidante fisiológica pelo organismo, e fornece maior quantidade de oxigênio para os tecidos (Bocci 2011). Ela tem-se demonstrado eficiente no tratamento de feridas extensas e de difícil cicatrização, sendo de baixo custo e com efeitos colaterais mínimos (Bocci 2007). O efeito cicatrizante dessa terapia foi relacionado com maior angiogênese, bem como um aumento dos fatores de crescimento endotelial vascular e expressão da ciclina D1, proteína presente em neovascularizações (Valacchi et al. 2011).

Estudos relacionados com o uso da VCI, isolada ou associada com a ozonioterapia na cicatrização de feridas não contaminadas em animais hígidos estão ausentes na literatura. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a Vibração de Corpo Inteiro, isolada ou associada ao bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado, na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas induzidas cirurgicamente, utilizando o rato Wistar como modelo experimental de curta duração. A hipótese é que a associação da terapia por vibração e ozonioterapia tópica seja mais benéfica na cicatrização de feridas cutâneas de ratos em relação à solução salina (0,9%) e a terapia de vibração e a ozonioterapia tópica isolada.

O estudo se justificou visto não existirem até o momento referências na literatura do uso da VCI e da ozonioterapia, isolados ou associados na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas de ratos hígidos, e assim justificando o seu ineditismo. Por outro lado, as terapias que usam vibração mecânica e gás ozônio possuem baixo custo, mínimo descarte de resíduos favorecendo à sustentabilidade ambiental, e efeitos colaterais mínimos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e ambiente de experimentação

A metodologia adotada no presente trabalho foi analisada pela Câmara de Ética de Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Botucatu, São Paulo (SP) (0176/2018).

Foram utilizados 96 ratos hígidos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, albinos, heterogenéticos, machos não submetidos à contracepção cirúrgica, com 14 semanas de idade, e massa corpórea entre 365 e 370 gramas. Os ratos foram adquiridos do Biotério Central (Unesp, Botucatu, SP), onde previamente foram submetidos aos protocolos de higiene determinados pelo biotério. Todos os ratos foram submetidos à vermifugação com ivermectina (1%) na quantidade de 0,1mL diluída em 100mL de água potável em bebedouro individual, a cada sete dias, durante duas semanas, antes de serem encaminhados para o local de estudo.

O estudo foi realizado na Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex), Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu, SP, Brasil, e o período de adaptação ao ambiente experimental foi de 30 dias. Os ratos foram alocados individualmente em caixas de acrílico (49x34x16cm) com tampa de arame cromado. Os ratos receberam água e ração comercial para ratos (Presence®) *ad libitum*. O ambiente das caixas foram enriquecidos com folhas sulfite amassadas. As caixas foram limpas a cada 48 horas, e o ambiente manteve-se com umidade e temperatura controlada e constante (temperatura de 22°C e umidade entre 30 e 40%), e o ciclo de luz foi de 12 horas claro e 12 horas escuro.

Aquisição do gás ozônio e do óleo de girassol ozonizado

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de média potência (Ozone & Life, Gerador de Ozônio O&L 1.5 RM), pela passagem do oxigênio por meio dele com fluxo de 3L/hora numa uma voltagem de 170V, produzindo uma concentração de 50µg/mL, e determinado por meio de um medidor de ozônio (Ozomat, Ozomat de Anseros, Alemanha).

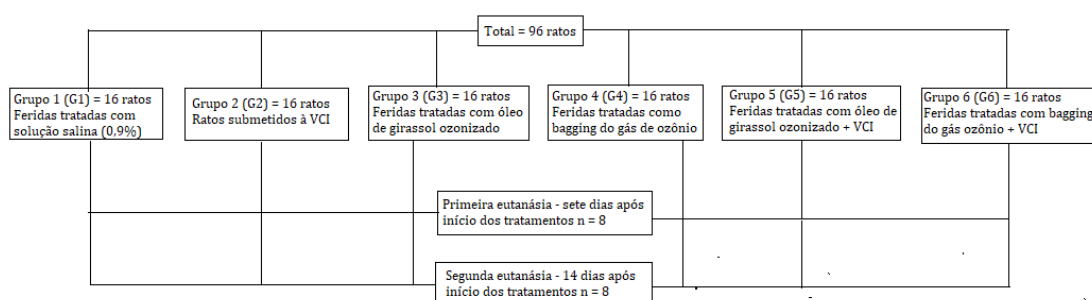
O óleo de girassol ozonizado (Ozontop®) composto por ácido linoleico (48-74%) e ácido oleico (14-39%) foi produzido pelo gerador de ozônio de alta potência (Trailgaz Labo model 12-02). O índice de peróxido maior que 400mEq/kg foi determinado de acordo com a literatura (British Pharmacopoeia 2000). O óleo foi submetido ao exame microbiológico antes de ser usado no estudo e teve resultado negativo para presença de bactérias e fungos.

Procedimento experimental

Os ratos foram pesados utilizando uma balança digital de bancada (Toledo Prix3 FIT®) e o protocolo anestésico foi realizado com associação de xilazina 2% (10mg/kg) e cloridrato de cetamina 1% (75mg/kg), por via intraperitoneal (IP). Posteriormente, foi realizada uma epilação manual desde a região atlanto-occipital caudal até a base da cauda, e desinfecção com clorexidina 2%. Feridas de 3cm de diâmetro (área = 7,1cm²) foram realizadas com auxílio de um “punch” metálico estéril no terço médio entre a distância da região atlanto-occipital caudal e base da

cauda. A pele e gordura subcutânea foram removidas com auxílio de tesoura Metzembaum e pinça anatômica estéreis. Preservou-se a fáscia muscular dorsal e a hemostasia foi realizada pelo método de compressão digital, utilizando-se gaze esterilizada. As feridas foram confeccionadas sempre pela mesma pessoa devidamente paramentada, respeitando a assepsia. A recuperação anestésica foi controlada a cada 10 minutos por meio de observação da frequência respiratória e cardíaca e foi realizada em local sem barulho e o movimento de pessoas foi restrito.

Os 96 ratos foram divididos por sorteio randomizado usando o programa Randomizer® (versão 2018) em seis grupos de 16 animais, de acordo com o tratamento da ferida e uso ou não da VCI: Grupo 1 (G1) –solução salina (0,9%); Grupo 2 (G2) –ratos submetidos à VCI; Grupo 3 (G3) – óleo de girassol ozonizado; Grupo 4 (G4) – exposição direta do gás de ozônio (bagging); Grupo 5 (G5) – óleo de girassol ozonizado e os ratos submetidos à VCI; Grupo 6 (G6) - exposição direta do gás de ozônio (bagging) e os ratos submetidos à VCI.



Os tratamentos iniciaram após a recuperação anestésica (média de 30 minutos) e repetidos a cada 24 horas durante 14 dias. Contudo, a exposição direta do gás ozônio ou bagging do gás ozônio foi realizada a cada 72 horas. Durante os tratamentos não foi realizada a remoção das crostas e as feridas permaneceram sem curativo durante todo o período de estudo. O controle de ingestão de alimentos e água foi realizada a cada 24 horas. Não foi administrado nenhum antibiótico ou anti-inflamatório. Contudo, após a confecção dos retalhos foi administrado tramadol (10mg/kg, subcutânea) a cada 12 horas durante 48 horas.

A solução salina (0,9%) foi aplicada por meio de uma seringa (1mL) estéril na quantidade de 0,1mL, e o óleo de girassol ozonizado (1 gota) foi colocado na ferida utilizando um conta-gotas estéril. O bagging do gás ozônio foi realizada por meio de um saco plástico (30x20cm) de capacidade de dois litros cobrindo toda a região da ferida. A cabeça e os membros torácicos permaneceram fora do saco plástico e a vedação foi realizada com faixa na região axilar, e uma sonda uretral nº10 foi acoplada à mangueira de saída do gerador de ozônio e a outra extremidade permaneceu dentro do saco plástico. Um tubo foi acoplado no gerador de ozônio e conectada ao cilindro de oxigênio por meio de uma torneira de três vias. A concentração do gás ozônio usado foi de 50µg/mL, e utilizou-se uma tabela individual específica do gerador. A válvula do oxigênio foi regulada para ¼ por litro por minuto, e o dosador de ozônio para 10 unidades. Com o gerador ligado, a torneira de três vias foi mantida virada para o destruidor de gás por 10 segundos, e em seguida foi direcionada para sonda uretral fixada no saco plástico. O saco foi inflado e as feridas permaneceram sob a ação do gás ozônio por cinco minutos.

Vibração de Corpo Inteiro

As sessões de VCI foram realizadas na plataforma vibratória (TheraPlate®, Texas, EUA) (92,0x62,0x16,0cm) (Figura 1A), que produz vibração por meio de circulação do tipo Vórtex. Os ratos foram colocados dentro de um tubo de cloreto de polivinil (PVC) (22,0cm de comprimento e 8,0cm de diâmetro), e fixados em cima da plataforma por meio de uma fita adesiva de polipropileno. Os tubos possuíam uma abertura na base para permitir que as patas tocassem na plataforma vibratória, e orifícios nas extremidades para permitir a ventilação (Figuras 1B e 1C).

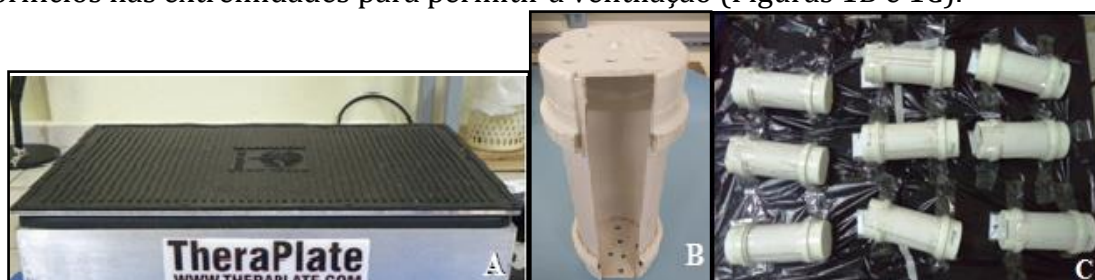


Fig 1. Plataforma vibratória (TheraPlate Revolution®) (92,0x62,0x16,0cm) (A). Tubos de PVC (22,0cm de comprimento e 8,0cm de diâmetro) (B). Tubos de PVC fixados com fita adesiva de polipropileno em cima da plataforma vibratória durante a sessão da VCI (C).

O protocolo de VCI foi de 45Hz [deslocamento pico a pico (amplitude) = 3,37mm; aceleração de pico = 21,59m/s², velocidade = 0,4 m/s] durante 30 minutos, a cada 24 horas, totalizando 14 dias. As frequências vibratórias da plataforma vibratória variaram entre 10 e 100Hz. Essas frequências foram verificadas por meio de um osciloscópio digital. O acelerômetro foi utilizado para medir a aceleração de pico (Apico). A amplitude (Dpico) foi calculada usando a fórmula: $Dpico = Apico / (2 \cdot f)^2$, f - frequência de vibração; e a velocidade (V) foi determinada pela seguinte fórmula: $V = Dpico \cdot \pi \cdot f$ ($\pi = 3,14$) (Rittweger 2010, Cochrane 2011). Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento, porém os ratos não submetidos à VCI (G1, G3 e G4) permaneceram em cima da plataforma desligada.

Os tratamentos foram realizadas às 08:00 horas pelo mesmo avaliador no Centro Veterinário de Análise de Movimento (CEVAM), FMVZ, Botucatu, Unesp, SP, com as condições de temperatura e umidade similar do biotério. A claridade externa foi evitada por meio de cortinas “blackout”, porém a luminosidade da sala foi mantida por meio de lâmpadas fluorescentes brancas. Antes dos tratamentos os ratos foram submetidos à adaptação ambiental por 15 minutos, e somente três pessoas permaneceram na sala e o barulho foi evitado.

A avaliação clínica, histológica e mensuração das feridas foram realizadas por três avaliadores independentes, e utilizou-se a metodologia encoberta.

Avaliação clínica

As variáveis avaliadas incluíram a massa corpórea (MC), temperatura corpórea (TC) e os parâmetros macroscópicos. A MC foi mensurada 24 horas antes da indução das feridas cutâneas (24hPRE), sete dias (7POS) e 14 dias após indução das feridas (14POS) utilizando-se uma balança digital de bancada (Toledo Prix3

FIT®). A TC foi aferida por meio de um termômetro digital (MC-246-BRV®), cinco minutos antes da indução das feridas e a cada 72 horas durante 14 dias.

As feridas foram avaliadas macroscopicamente pela presença ou ausência de crosta, pus e tecido de granulação. Para a análise estatística as variáveis crosta e tecido de granulação foram classificadas com um escore semi-quantitativo de acordo com a intensidade em leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3). A variável pus foi classificada como ausente e presente. Os momentos avaliados foram: terceiro dia após indução das feridas (3POS), 7POS, 10º dia após indução das feridas (10POS) e 14POS.

Swabs estéreis foram realizados nas feridas dos animais de todos os grupos e enviados para análise microbiológica nos momentos: 3POS e 7POS.

Mensurações das feridas

Os parâmetros avaliados incluíram a área e contração das feridas (porcentagem de recuperação da ferida). Os valores foram determinados em dois momentos distintos: 7POS e 14POS. Todos os animais tiveram suas feridas fotografadas por câmera digital (Canon® PowerShot sx160 is) e o software *Image J*® foi usado para mensurar a área das feridas. O grau de contração foi realizado de acordo com a fórmula:

$$(\text{área inicial} - \text{área do dia da medida}) / \text{área inicial} \times 100 \text{ (Agren et al. 1997)}$$

Eutanásia

Oito ratos de cada grupo foram submetidos às biopsias excisionais, após eutanásia com tiopental sódico (120mg/kg) por via intraperitoneal (Horn et al. 2013), aos sete e 14 dias de tratamento (7POS e 14POS). As feridas foram excisadas com margem de 1cm de pele íntegra em torno da lesão, e em profundidade até a fáscia muscular. Do total do diâmetro da ferida, 50% foram utilizados para avaliação histológica e 50% para a avaliação tensiométrica.

Avaliação tensiométrica

A avaliação da força tensil máxima (FTM) ou força de ruptura e da deformidade máxima tecidual (DMT) foi realizada aos 7POS e 14POS. As amostras teciduais retangulares contendo a ferida e com 2cm de tecido hígido em cada extremidade foram envolvidas em gaze estéril embebida em solução salina (0,9%) e em seguida foram submetidos à avaliação tensiométrica. As amostras foram fixadas na máquina de teste mecânico universal (EMIC®) por meio de prensas, e com distância de 1,0cm de cada lado da extremidade da amostra, e área livre de 1,0cm da ferida (Figura 2). O ensaio foi realizado no sentido vertical, onde a porção inferior do equipamento era imóvel e a superior móvel. Foi usada uma velocidade de tração constante de 20mm/segundo e célula de carga na faixa de 1 a 50N com uma resolução de leitura 0,01N, e os valores da FTM e DMT foram avaliados no software do equipamento.

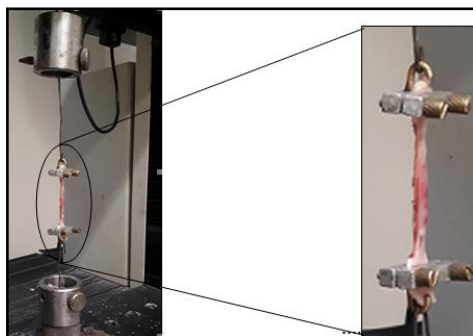


Fig 2. Teste tensiométrico ferida utilizando equipamento de força tensil (EMiC®).

Avaliação histológica

Os espécimes para a avaliação histológica foram colocados em frascos de formaldeído 10% tamponado por 24 horas e, posteriormente mantidas em álcool 70% até a inclusão em parafina. Cortes de 5µm foram obtidos nas amostras, e os fragmentos foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação histológica. As lâminas foram observadas no microscópio ótico (Zeiss®), com objetivas de 10x e 40x, sendo que 10 áreas foram identificadas e avaliadas, e as imagens foram registradas por fotomicrografia utilizando o programa analisador de imagem (Axio Vision Rel4.8). Para a análise estatística as variáveis que incluíram o infiltrado celular inflamatório (intensidade e característica celular), a vascularização e os fibroblastos foram classificadas com um escore semi-quantitativo, de acordo com a quantidade, em leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3). Quanto à distinção das camadas superficial e profunda da derme, classificou-se como ausente ou presente.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPadPrism® (versão 5.01). Para análise estatística dos dados macroscópicos em cada um dos grupos foi empregada a análise de variância (ANOVA) para amostras repetidas, com contrastes pelo método de Tukey ou teste t de Student não pareado. Para avaliação entre momentos foi usado teste de Friedman (função "friedman.test" do pacote "stats") para as variáveis que não obedeceram às características da normalidade. Para que os empates no ranking estabelecido pelo teste de Friedman não influenciassem nos resultados, o valor de probabilidade de rejeição da hipótese nula foi corrigido com o procedimento de taxa de descoberta falsa (função "pairwiseSignTest" do pacote "rcompanion"). Para comparação entre os grupos, em cada momento avaliado, empregou-se a análise de variância para amostras independentes (ANOVA One way) para dados normais, e teste de Kruskal-Wallis (função "kruskal" do pacote "agricolae") para variáveis fora das condições da normalidade. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$. Com relação aos dados histológicos empregaram-se os teste qui-quadrado e teste exato de Fisher. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação clínica

Não foi observada variação na ingestão de água e comida, óbito ou autotraumatismo durante todo o período do estudo. A massa e a temperatura corpórea não apresentaram variações significativa, mantendo-se dentro dos padrões de referência da espécie (Quadros 1 e 2).

Quadro 1. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] dos valores da massa corpórea (gramas) dos ratos dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 avaliados 24 horas antes da indução das feridas cutâneas (24hPRE), sete dias (7POS) e 14 dias após indução das feridas (14POS)

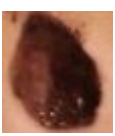
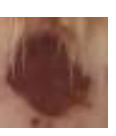
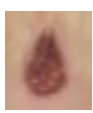
Grupos	24hPRE	7POS	14POS
	Med(min - max)	Med (min - max)	Med (min - max)
G1	365,0 (300-400)	379,0 (325-415)	394,5 (336-453)
G2	365,0 (330-410)	377,0 (350-408)	380,5 (345-432)
G3	370,0 (300-430)	370,5 (337-433)	390,0 (310-430)
G4	364,0 (300-410)	374,0 (320-410)	390,0 (335-455)
G5	363,0 (330-410)	376,0 (35-409)	380,0 (340-430)
G6	369,0 (300-420)	370,0 (330-430)	392,5 (315-435)

Quadro 2. Mediana (Med) e amplitude [mínima (min) e máxima (max)] dos valores da temperatura corpórea (°C) dos ratos dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 avaliados 24 horas antes da indução das feridas cutâneas (24hPRE), terceiro dia (3POS) e sétimo dia após indução das feridas (7POS), e dez dias (10POS) e 14 dias após indução das feridas (14POS)

Grupos	24hPRE	3POS	7POS	10POS	14POS
	Med (min - max)	Med (min - max)	Med (min - max)	Med (min - max)	Med (min - max)
G1	36,5(36,1-37,0)	36,4(36,0-37,0)	36,2(36,0-36,5)	37,0(36,8-37,3)	36,8(36,5-36,9)
G2	36,4(36,3-36,9)	36,3(36,2-36,8)	36,2(36,2-36,5)	36,6(36,4-36,7)	36,7(36,5-36,9)
G3	37,0(36,9-37,1)	37,2(36,8-37,3)	37,1(36,9-37,2)	37,0(36,7-37,2)	37,0(36,7-37,2)
G4	37,0(36,9-37,1)	36,9(36,5-37,0)	36,6(36,4-36,7)	37,1(36,6-37,2)	36,9(36,7-37,1)
G5	36,4(36,1-36,8)	36,3(36,2-36,6)	36,1(36,0-36,4)	36,4(36,2-36,6)	36,8(36,6-37,2)
G6	35,9(35,5-36,4)	36,1(35,9-36,3)	36,1(35,9-36,5)	36,3(36,1-36,4)	36,6(36,4-36,9)

Na avaliação macroscópica não foi identificado presença de pus em nenhuma ferida. Contudo, foi evidenciado presença de crosta e tecido de granulação. Essas variáveis não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e entre os momentos avaliados. A presença de crosta foi observada com maior intensidade no terceiro dia após indução das feridas início em todos os animais. A sua diminuição ocorreu de forma gradual até o sétimo dia após indução das feridas. No terceiro dia após o procedimento cirúrgico foi observado tecido de granulação com intensidade leve em todos os grupos. No sétimo dia após indução das feridas, o tecido de granulação foi identificado com intensidade moderada no G2 e G6, e intensidade leve nos restantes grupos. No 10º e 14º dia após a realização das cirurgias, o tecido de granulação prevaleceu somente no G1. No quadro 3 foi apresentado a evolução cicatricial das feridas de todos os grupos. Nas feridas dos ratos de todos os grupos, excetuando o G1 e G2, não foi identificado o crescimento bacteriano e fúngico no 3POS e 7POS. Nas feridas do G1 e G2 foi evidenciado presença de *Pseudomonas aeruginosa* somente no terceiro dia após a indução das feridas.

Quadro 3. Evolução das feridas tratadas com solução salina (0,9%) (G1), ratos submetidos à VCI (G2), feridas tratadas com óleo de girassol ozonizado (G3), feridas tratadas com exposição direta do gás de ozônio (bagging) (G4), feridas tratadas com óleo de girassol ozonizado e os ratos submetidos à VCI (G5), feridas tratadas com exposição direta do gás de ozônio (bagging) e os ratos submetidos à VCI (G6) no sétimo dia após indução das feridas (7POS) e 14 dias após indução das feridas (14POS)

Grupos/Momentos	G1	G2	G3	G4	G5	G6
7POS						
14POS						

Mensurações das feridas e avaliação tensiométrica

A avaliação das medidas das feridas e dos valores tensiométricos foram representados no quadro 4. Em relação aos valores das áreas e das contrações das feridas foi identificado uma diminuição e aumento significativo ($p<0,01$), respectivamente, em todos os grupos entre sete dias e 14 dias após indução das feridas. Na avaliação das áreas entre os grupos foi evidenciado que os grupos G1, G2 e G3 apresentaram valores significante maiores ($p<0,05$) quando comparados com os grupos G4, G5 e G6, em ambos os momentos. Os valores das contrações das feridas foram estatisticamente menores ($p<0,05$) nos grupos G1, G2 e G3 quando comparados com os grupos G4, G5 e G6 ao sétimo dia após a indução das feridas, e com os grupos G4, G5 e G6 no momento 14POS (Quadro 4).

Na avaliação tensiométrica foi evidenciado um aumento significativo ($p<0,05$) da força tensil máxima nas feridas tratadas com óleo de girassol ozonizado e os ratos submetidos à VCI (G5) entre os momentos 7POS e 14POS. Quando comparado estatisticamente os valores da mesma variável entre os grupos, identificou-se valores maiores ($p<0,01$) nos grupos G4, G5 e G6 em relação ao grupo G2 em ambos os momentos. Os valores da deformidade máxima tecidual apresentaram diminuição estatística ($p<0,01$) em todos os grupos excetuando o G5 entre 7POS e 14POS. Na avaliação da mesma variável entre os grupos foi evidenciado valores significamente maiores ($p<0,05$) nos grupos G4, G5 e G6 em relação aos grupos G1, G2 e G3 em ambos os momentos (Quadro 4).

Quadro 4. Média e desvio padrão (DP) dos valores das áreas e contrações das feridas; força tensil máxima e deformidade máxima tecidual das feridas dos ratos dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6 avaliados sete dias (7POS) e 14 dias após a indução das feridas (14POS)

Grupos	7POS Média ± DP	14POS Média ± DP
Área (cm ²)		
G1	10,8 ± 1,04 ^{Aa}	4,06 ± 0,64 ^{Ba}
G2	9,40 ± 1,47 ^{Aac}	3,97 ± 1,11 ^{Bac}
G3	9,93 ± 1,46 ^{Aad}	3,52 ± 0,17 ^{Bad}
G4	8,12 ± 1,40 ^{Abc}	2,13 ± 0,68 ^{Bbc}
G5	8,57 ± 0,86 ^{Abc}	3,45 ± 0,79 ^{Babc}
G6	7,59 ± 0,53 ^{Ac}	2,08 ± 0,42 ^{Bc}
Contração (%)		
G1	3,87 ± 6,83 ^{Aa}	63,63 ± 6,50 ^{Ba}
G2	16,38 ± 12,33 ^{Aac}	64,38 ± 11,46 ^{Ba,c}
G3	6,25 ± 15,37 ^{Aad}	66,75 ± 1,98 ^{Bad}
G4	24,5 ± 13,94 ^{Abc}	80,13 ± 6,05 ^{Bb}
G5	28,5 ± 7,54 ^{Abc}	71,25 ± 6,79 ^{Bae}
G6	30,25 ± 10,28 ^{Ac}	81,0 ± 3,46 ^{Bb}
Força tensil máxima (N)		
G1	3,00 ± 1,30 ^{Aab}	3,10 ± 1,10 ^{Aab}
G2	1,80 ± 0,59 ^{Aa}	4,10 ± 1,20 ^{Ba}
G3	3,90 ± 2,20 ^{Aab}	4,20 ± 1,30 ^{Aab}
G4	5,00 ± 1,40 ^{Ab}	3,40 ± 2,50 ^{Ab}
G5	6,10 ± 1,30 ^{Ab}	3,50 ± 1,40 ^{Bb}
G6	3,20 ± 2,10 ^{Aab}	4,00 ± 1,80 ^{Aab}
Deformidade máxima tecidual (mm)		
G1	9,50 ± 2,20 ^{Aa}	5,20 ± 1,70 ^{Ba}
G2	9,30 ± 2,10 ^{Aa}	5,30 ± 1,30 ^{Ba}
G3	9,40 ± 2,60 ^{Aa}	5,70 ± 1,20 ^{Ba}
G4	12,00 ± 2,90 ^{Ab}	6,00 ± 2,00 ^{Bb}
G5	11,00 ± 2,80 ^{Ab}	6,20 ± 2,10 ^{Ab}
G6	10,00 ± 3,70 ^{Ab}	6,20 ± 1,00 ^{Bb}

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferiram significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras minúsculas diferiram significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Avaliação histológica

Na comparação entre grupos foram identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no sétimo dia após a indução das feridas em relação à intensidade do infiltrado inflamatório entre o G1 (intensa – grau 3) e G2, G4 e G6 (leve - grau 1). No 14º dia após a realização das cirurgias, foram evidenciadas variações estatísticas ($p < 0,05$) entre o G1 (intenso – grau 3) e os restantes grupos (leve – grau 1). Na avaliação entre os momentos foi identificada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) das células inflamatórias somente nas feridas tratadas com óleo de girassol ozonizado (G3), de intenso (grau 3) para intensidade leve (grau 1). As feridas tratadas com solução salina (0,9%) (G1) foram as únicas que evidenciaram intensa inflamação em ambos os momentos.

Com relação ao tipo de células inflamatórias foi observado que sete dias após a indução das feridas (7POS) os neutrófilos predominaram nas feridas dos grupos G1 e G3, e nas feridas dos restantes grupos ocorreu a presença de células polimorfonucleadas e mononucleadas. Após 14 dias da indução das feridas em todos

os grupos, excetuando o grupo tratado com solução salina (0,9%) (G1), foi identificado o predomínio de células mononucleadas (macrófagos).

Não foram observadas variações significativas com relação à variável neovascularização e fibroblastos. Somente as feridas dos ratos dos grupos G5 e G6 apresentaram distinção das camadas dérmicas em ambos os momentos. Após 14 dias da indução das feridas todos os grupos evidenciaram distinção das camadas dérmicas, excetuando o grupo tratado com solução salina (0,9%) (G1). Na figura 3 foram ilustradas as lesões nos exames histológicos das feridas cutâneas.

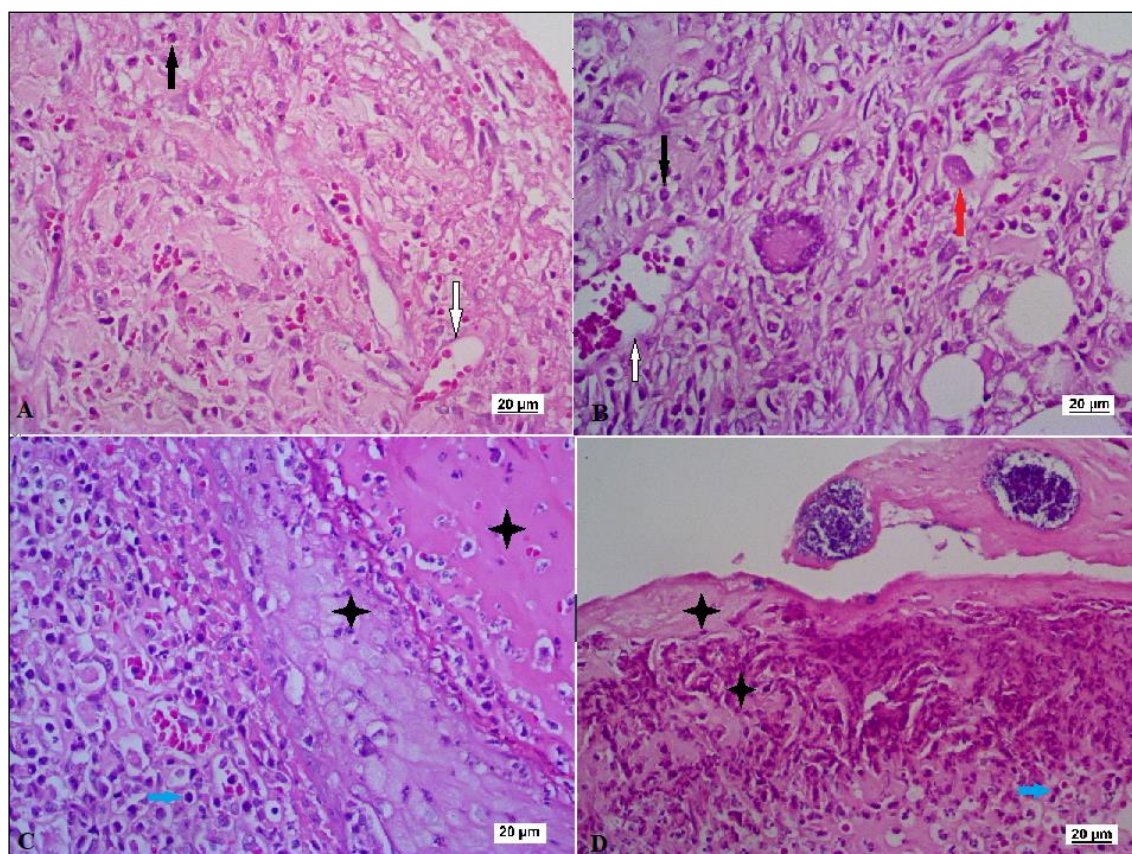


Fig 3. Lesão histológica das feridas tratadas com solução salina (0,9%) e óleo de girassol ozonizado e os ratos submetidos à VCI (G5) (A) e feridas tratadas com exposição direta do gás de ozônio (bagging) e os ratos submetidos à VCI (G6) (B), sete dias (7POS) (C) e 14 dias após indução das feridas (14POS) (D). Evidenciou-se infiltrado inflamatório polimorfonucleares (neutrófilos) (setas pretas), macrófago (seta vermelha), infiltrado mononuclear (setas azuis), neovascularização (setas brancas) e camadas dérmicas (estrelas pretas) [H&E].

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a ação cicatrizante da VCI, isolada ou associada à ozonioterapia tópica, na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas em ratos hígidos, confirmando o benefício da associação. Desse modo, foi comprovada a hipótese inicial que a associação da terapia por vibração e ozonioterapia tópica seria mais benéfica na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas de ratos hígidos. O uso da VCI associada ou não a ozonioterapia na cicatrização de feridas não contaminadas em animais ou pacientes hígidos está ausente na literatura. Contudo, Mahran et al. (2013), Weinheimer-Haus et al. (2014), Yu et al. (2017) pesquisaram os efeitos da VCI na cicatrização de feridas de pacientes humanos e ratos diabéticos, como também em feridas mimetizando úlceras de decúbito em ratos (Arashi et al. 2010, Sari et al. 2015). Estudos randomizados e controlados utilizando a ozonioterapia tópica são escassos na literatura (Valacchi et al. 2011). Esse fato corroborou com o estudo sistemático sobre o uso do gás ozônio no tratamento de feridas cutâneas realizado por Franco et al. (2019), entre os anos de 2005 a 2015, onde foi identificado 118 artigos, dos quais quatro foram inclusos no estudo, e na sua maioria foi relacionado com o uso do gás ozônio em úlceras de pé em pacientes humanos diabéticos.

Não foram observados efeitos colaterais pelo uso da VCI e aplicação do bagging do gás de ozônio ou óleo de girassol ozonizado nas feridas durante os 14 dias de tratamento. Contudo, hemorragia vítrea, e alterações no sistema urinário foram identificados em pacientes humanos após o uso agudo da VCI (Jordan et al. 2005, Monteleone et al. 2007, Franchignoni et al. 2013). Os efeitos tóxicos induzidos pelo gás ozônio foram evitados mediante o uso de sacos plásticos no momento do bagging de gás ozônio, visto que os materiais de látex são formados por poliisopreno, e torna-se tóxico quando é oxidado pelo gás ozônio (Di Paolo et al. 2004, Bocci 2007).

A presença de *Pseudomonas aeruginosa* nas feridas tratadas com a terapia de vibração revelou que a VCI não possui qualquer efeito antibacteriano sobre às contaminações oportunistas que possam ocorrer em feridas abertas visto que esse microrganismo causa infecções em um sistema imunológico debilitado. Contrariamente, o bagging do gás ozônio e o óleo ozonizado possuem efeitos antimicrobianos, corroborando com a literatura (Di Paolo et al. 2004). A ausência de pus nas feridas associada à inexistência de variação da temperatura e da massa corpórea em todos os animais excluiu a presença de contaminação ou infecção, como também o estresse pelo uso das terapias de vibração e da ozonioterapia tópica, e desse modo diminuiu a possibilidade de retardar o processo cicatricial devido ao prolongamento da fase inflamatória (Campos et al. 2007, Oliveira & Dias 2012, Yaghoobi et al. 2013).

O protocolo da VCI usado foi de acordo com o preconizado pela literatura (Weinheimer-Haus et al. 2014, Sari et al. 2015, Yu et al. 2017), excetuando em relação a frequência das sessões, onde no presente estudo os animais foram submetidos à VCI a cada 24 horas.

A diminuição significativa dos valores das áreas das feridas e aumento significativo da porcentagem de contração das feridas em todos os grupos, e identificação de menor área e maior contração nas feridas do grupo tratado com o bagging associada à VCI (G6) sugeriu que a exposição direta do gás de ozônio nas feridas associado à sessões de vibração mecânica demonstrou melhores efeitos

positivos macroscópicos na cicatrização de feridas cutâneas dos ratos. Resultados similares foram observados nas feridas de ratos diabéticos submetidos às sessões de VCI com protocolos de frequências vibratórias entre 35 e 45Hz (20 minutos) (Weinheimer-Haus et al. 2014, Yu et al. 2017). Paralelamente, Sari et al. (2015) identificaram resultados similares em feridas profundas de ratos utilizando protocolo de 47Hz por 15 minutos.

As feridas tratadas com o óleo de girassol e os ratos submetidos às sessões de VCI (G5) apresentaram um aumento significativo com relação aos valores da força tensil máxima, contudo às feridas tratadas com o óleo de girassol ozonizado apresentaram maior resistência tensil de suas feridas. De acordo com esses resultados deduziu-se que o óleo de girassol ozonizado associado à terapia de vibração permitiu a produção de um tecido cicatricial de melhor qualidade, corroborando com maior quantidade de fibroblastos presentes nesse grupo. Campos et al. (2007) relacionaram a força tensil máxima com a fase proliferativa, sendo que nessa fase ocorre a formação de colágeno mais espesso após absorção do colágeno III, refletindo em um aumento da força tensil da ferida (Ehrlich et al. 2001, Matayoshi et al. 2007, Alberti et al. 2008).

O processo cicatricial é considerado um evento dinâmico que ocorre com a sobreposição das fases da cicatrização (Oliveira et al 2012). No presente estudo, as fases inflamatória e proliferativa corresponderam ao primeiro e ao segundo momento de avaliação histológica, sete dias e 14 dias após indução das feridas (Campos et al. 2007, Mendonça & Netto 2009, Oliveira et al 2012). Na avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório foram verificadas diferenças significativas no sétimo dia após a realização das feridas em relação à intensidade do infiltrado inflamatório intenso (células polimorfonucleares - neutrófilos) nos ratos do grupo G1, e intensidade leve (células polimorfonucleares e mononucleares - macrófagos) nos ratos dos grupos G2, G4 e G6. Contudo, após 14 dias de tratamento somente as feridas tratadas com solução salina (0,9%) (G1) mantiveram presença intensa do infiltrado inflamatório caracterizado por neutrófilos, e os demais grupos apresentaram intensidade leve de células de reação inflamatória mononucleares. Esses resultados associados à ausência de variação significativa com relação à neovascularização e fibroplasia, e inexistência das camadas dérmicas em todos os grupos, excetuando nos grupos G5 e G6, confirmou-se que histologicamente que as feridas tratadas com a associação da terapia de vibração por meio da VCI e ozonioterapia tópica (G5 e G6) obtiveram melhor efeito cicatrizante. A diminuição dos neutrófilos e aumento de macrófagos nas feridas dos ratos submetidos à terapia de vibração foi associado com o possível aumento dos fatores de crescimento e quimiocinas (fator de crescimento semelhante à insulina-1, FCEV e proteína quimiotática-1 de monócitos) determinando um efeito anabólico (Weinheimer-Haus et al. 2014). A principal limitação do estudo foi a ausência de avaliação imunoistoquímica (morfometria celular e vascular) e da quantificação do colágeno por meio da coloração de Tricrômico de Masson. Neste contexto, futuros estudos devem ser realizados com a inclusão dessas técnicas.

CONCLUSÕES

A associação da VCI e bagging do gás ozônio ou óleo de girassol ozonizado é mais efetivo em relação ao uso isolado da terapia por vibração e ozonioterapia tópica na cicatrização de feridas cutâneas limpas de ratos hígidos.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa de mestrado (Código de Financiamento 001), ao setor de Patologia Veterinária (FMVZ – Unesp, Botucatu), ao Luiz Carlos Edevalter Bardella (UNIPEX, Unesp, Botucatu) pela ajuda na realização da tensiometria cicatricial, e ao José Eduardo Cury Ramos (Ozontop - produtos ozonizados) por ter cedido o óleo de girassol ozonizado.

Declaração de conflito de interesse: Os autores declaram que não tiveram quaisquer conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Agren M.S., Mertz P.M. & Franzén L. 1997. A comparative study of three occlusive dressing in the treatment of full-thickness wounds in pigs. *Journal of American Academy Dermatology* 36(1): 53-58.
- Alberti L.R., Vasconcellos L.S. & Petroianu A. 2008. Resistência cicatricial cutânea sob efeito de hidrocortisona local ou sistêmica, em distintos períodos pós-operatórios. *Einstein* 6(3):269-73.
- Arashi M., Sugama J., Sanada H., Konya C., Okuwa M. & Nakagami G. 2010. Vibration therapy accelerates healing of stage I pressure ulcers in older adult patients. *Advance Skin Wound Care* 23: 321-327.
- Bocci V., Zanardi I. & Travagli V. 2011. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical Gas Research* 1(1):62-9.
- Bocci C. 2007. The case for oxygen-ozone therapy. *British Journal of Biomedical Science* 64(1):44-48.
- British Pharmacopoeia. 2000. Peroxide value, London, Appendix XF, IA, IB. 361p.
- Campos A.C.L., Branco A.B. & Groth A.K. 2007. Cicatrização de feridas. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva* 20(1):51-8.
- Carstanjen B., Balali M. & Gajewski Z. 2013. Short-term whole-body vibration exercise in adult healthy horses. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 16(2):403-405.
- Carstanjen B., Pennecke J., Boehart S. & Müller K.E. 2010. Unilateral polydactylysm in a German Holstein-Friesian calf - A case report. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 40(1):69-74.
- Caselli A., Spallone V., Marfia G.A., Battista C., Pachatz C., Veves A. & Uccioli L. 2006. Validation of the nerve axon reflex for the assessment of small nerve fibre dysfunction. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 77(8):927-932.
- Cochrane D.J. 2011. Vibration exercise: the potential benefits. *International Journal of Sports Medicine* 32(2):75-99.
- Di Paolo N., Bocci V. & Gaggiotti E. 2004. Ozone therapy. *International Journal of Artificial Organs* 27(3):168-175.
- Ehrlich H.P., Keefer K.A., Maish G.O., Myers R.L. & Mackay D.R. 2001. Vanadate ingestion increases the gain in wound breaking strength and leads to better organized collagen fibers in rats during healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 107(2):471-7.

- Ennis W.J., Meneses P. & Borhani M. 2008. Push-pull theory: using mechanotransduction to achieve tissue perfusion and wound healing in complex cases. *Gynecologic oncology* 111(2):81-86.
- Franco D.F.R., Bezerra S.R.S, Da Silva T.G.M. & Martins C.C. 2019. Uso terapêutico do ozônio no tratamento de lesões cutâneas. *Unifunec Ciências da Saúde e Biologia* 3(5):1-10.
- Freire L., Rahal S.C., Santos I.F.C., Teixeira C.R., Inamassu L.R. & Mamprim M.J. 2015. Renal resistive index of adult healthy dogs submitted to short-term whole-body vibration exercise. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 10:797-802.
- Griffin M.J., Welsh A.J. & Bovenzi M. 2006. Acute response of finger circulation to force and vibration applied to the palm of the hand. *Scandinavian journal of work, environment & health* 32:383-391.
- Halsberghe B.T., Gordon-Ross P. & Peterson R. 2017. Whole body vibration affects the cross-sectional area and symmetry of the m. multifidus of the thoracolumbar spine in the horse. *Equine Veterinary Education* 29(9):493-499.
- Horn C.C, Kimball B.A., Wang H., Kaus J., Dienel S., Nagy A., Gathright G.R., Yates B., & Andrews P.L.R. 2013. Why Can't Rodents Vomit? A Comparative Behavioral, Anatomical, and Physiological Study. *Plos One* 8(6): e10.1371.
- Jordan M.J., Norris S.R., Smith D.J. & Herzog W. 2005. Vibration training: an overview of the area, training consequences, and future considerations. *The Journal of Strength and Conditioning Research* 19:459-466.
- Mahran H.G., Helal O.F. & Fiky A.A.R. 2013. Effect of mechanical vibration therapy on healing of foot ulcer in diabetic polyneuropathy patients. *Journal of American Science* 9(7):76-87.
- Malagutti W. & Kakiyara C.T. 2010. Curativos, estomias e dermatologia: uma abordagem multiprofissional. São Paulo: Martinari. *Enfermería Global* 9(2):211.
- Matayoshi S., Hanaoka B.Y., Osaka J., Tolosa E.M.C. & Margarido N.F. 2007. Comportamento biomecânico da pálpebra reconstruída. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias* 34(1):31-34.
- Mendonça R.J. & Netto J.C. 2009. Cellular aspects of wound healing. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 84(3):257-62.
- Mörschbacher P.D., Lamberts M., Tuane N.A.G. & Emerson AC. 2011. Uso de membrana biológica de hemicelulose (VELODERM) e pomada de calêndula (*Calendula officinalis*) como adjuvante na cicatrização músculo-cutânea em um cão. *Veterinária e Zootecnia* 18(3):366-370.
- Oliveira I.V.P.M. & Dias R.V.C. 2012. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Veterinária Brasília* 6(4):267-271.
- Rittweger J. 2010. Vibration as an exercise modality: how it may work, and what its potential might be?. *European Journal of Applied Physiology* 108:877-904.
- Rocha C.B.J. & Reis N.S. 2005. Estudo comparativo do efeito de glicosaminoglicanas ácidas sulfatada (Hirudóid) e não-sulfatada (ácido hialurônico) e da própolis sobre a cicatrização da pele de ratos albinos. *Revista Científica da Universidade de Franca* 5(1/6):101-109.
- Santos I.F.C., Rahal S.C., Santos A., Inamassu L., Rodrigues M., Tsunemi M., Maprim M.J., Rodrigues C., Teixeira C. & Sato T. 2019. Whole-body vibration on leg muscles thermography and femoral resistive index of in adult healthy dogs. *Research in Veterinary Science* 122:118-123.

- Santos I.F.C., Rahal S.C., Freire L., Teixeira C.R., Inamassu L.R., Mamprim M.J., Gomes M.V.F. & Tannus F.C.I. 2017. Acute effect of whole-body vibration in a female dog with metritis. *Acta Scientiae Veterinariae* 45:185.
- Santos I.F.C., Rahal S.C., Shimono J., Tsunemi M., Takahira R. & Teixeira C.R. 2017. Whole-body vibration exercise on hematology and serum biochemistry in healthy dogs. *Journal Topics in Companion Animal Medicine* 32:86-90.
- Sari Y., Sanada H., Minematsu T., Nakagami G., Nagase T., Huang L., Noguchi H., Mor T., Yoshimura K. & Sugama J. 2015. Vibration inhibits deterioration in rat deep-tissue injury through HIF1-MMP axis. *Wound Repair and Regeneration* 23(3):386-93.
- Valacchi G., Lim Y., Belmonte G., Miracco C., Zanardi I., Bocci V. & Travagli V. 2011. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair and Regeneration* 19:107-115.
- Weinheimer-Haus E.M., Judex S., Ennis W.J. & Koh T.J. 2014. Low-intensity vibration improves angiogenesis and wound healing in diabetic mice. *Plos One* 9(3):1-8.
- Yaghoobi R., Kazerouni A. & Kazerouni O. 2013. Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: A review. *Jundishapur Journal Natural Pharmaceutic Products* 8(3):100-4.
- Yu C.O.L., Leung K., Jiang J.L., Wang T.B., Chow S.K. & Cheung, W. 2017. Low-magnitude high-frequency vibration accelerated the foot wound healing of n5-streptozotocin-induced diabetic rats by enhancing glucose transporter 4 and blood microcirculation. *Scientific reports* 7: e11631.

ANEXOS

Anexo 1.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



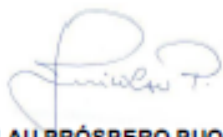
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto que o Projeto "AVALIAÇÃO DA PLATAFORMA VIBRATÓRIA "THERAPLATE" COMO ADJUVANTE NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS TRATADAS COM OZONIOTERAPIA TÓPICA EM RATOS WISTAR." **Protocolo CEUA 0176/2018**, a ser conduzido por Gustavo Manea Ferreira, responsável/orientador Ivan Felismino Charas dos Santos, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	10/09/2018 a 28/12/2018
Nome Comum / Espécie / Linhagem	ROEDOR / RATTUS NOVERGICUS / Heterogênia
Raça	Wistar
Nº de animais machos	96
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	400 gr
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 3 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Biotério Central

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 14/11/2018



JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu - SP - 13061-900

SÚMULA CURRICULAR

<http://lattes.cnpq.br/0931854213754905>

1) FORMAÇÃO

2018 - 2020: Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal. Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Botucatu. Bolsista CAPES.

2016 – 2018: Especialização em Residência - Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais. (Carga Horária: 3856h). Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Brasil. Bolsista do(a): Associação Prudentina de Educação e Cultura, APEC, Brasil.

2009 – 2014: Graduação em Medicina Veterinária. Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Brasil. Bolsista do(a): Programa Universidade para Todos, PROUNI, Brasil.

2) ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

SILVA, B. M.; SANTOS, I. F. C.; DOICHE, D. P.; AZEVEDO, M. G. P.; MARTINS, D. J. C. ; CAMARGO, B. W. D. F. ; AGOSTINHO, M.; FERREIRA, G. M. ; BRANCO, M. P.; SALEWSKI, G. C. Femoral Diaphyseal Fractures Fixation Technique Using an Adjustable Nylon Tie in Dog (*Canis lupus familiaris*) and Cat (*Felis catus domesticus*). *Acta Scientiae Veterinariae* (ONLINE), v. 46, p. 296, 2018.

GABRIELA ABONIZIO, AMANDA; SENIL KALIL, AMANDA; LUIZ ALBERTINI, ANDRÉ ; FILAZ VIEIRA, ANDRESSA ; TOLEDO DURAN FOGLIA, BRUNA ; ANGELO BERNARDI, CAMILA ; MENOSSI SUEZA LIMA, CAMILA ; PRADA KANASHIRO, GLAUCIA ; MANEA FERREIRA, GUSTAVO ; FRANCO ANDRADE, SILVIA. FECALOMA EM GATO: RELATO DE CASO. *Colloquium Agrariae* (UNOESTE), v. 14, p. 177-182, 2018.

SANTOS, I. F. C.; INAMASSU, L. R.; RAHAL, S. C.; MAMPRIM, M. J.; MARTINS, D. J. C.; FERRO, B. S.; SILVA, B. M.; FERREIRA, G. M.; BRANCO, M. P.; SILVA JUNIOR, J. I. S. Femoral Artery Dopplerfluxometry of Adult Healthy Dogs (*Canis lupus familiaris*). ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE (ONLINE), v. 46, p. 1596, 2018.

3) ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

SANTOS, I. F. C.; FERRO, B. ; FERREIRA, G. M. ; BRANCO, M. P. ; SILVA, B. M. ; ASSIS, A. C. G. ; REIS, M. G. ; SATO, THAIS ; RAHAL, S.C. Prevalência de tumor venéreo transmissível em cães (*Canis Lupus Familiaris*) na região de Garça, São Paulo, Brasil. Medicina Veterinaria-Recife, 2021.

BRANCO, M. P. ; RAHAL, S. C.; FERREIRA, G. M.; VETTORATO, M. ; TRINDADE, P. H. E. ; FOGACA, J.; Rocha, N.S. ; BRASILEIRO, F. ; MACHADO, V. M. V. ; SANTOS, I. F. C. Effect of Mixture of Honey and Propolis in Different Excipients on Skin Wound Healing in Rats. Acta Medica Iranica, 2021.

SILVA, B. M. ; CARDOSO, T. G. M. ; FERREIRA, G. M. ; SILVA JUNIOR, J. I. S. ; SANTOS, M. M. ; WOODS, L. ; SAKATA, S. ; SANTOS, I. F. C. Fraturas em cães (*Canis lupus familiaris*) e gatos (*Felis catus*) na região de Garça, São Paulo: Estudo retrospectivo. MEDVEP. Revista Científica De Medicina Veterinária. Pequenos Animais E Animais De Estimação, 2020.

BLAZIZZA, M. F. S.; RAHAL, S.C.; SANTOS, I. F. C. ; SILVA, B. M.; FERREIRA, G. M. ; OBA, E.; TSUNEMI, M.; TAKAHIRA, R. . Effects of a single session of whole-body vibration exercise on hematological and biochemical parameters, and serum cortisol levels in cats. Comparative Exercise Physiology, 2020.

SANTOS, I. F. C.; RAHAL, S. C. ; BRANDAO, C.V.S. ; FERREIRA, G. M. ; SILVA JUNIOR, J. I. S. ; SILVA, B. M. ; BRANCO, M. P. ; LIMA, M. T. ; TOMACHEUSKI, R. M. ; KRIECH, A. M. T. ; TRINDADE, P. H. E. ; LOIBL, L. T. ; SANTOS, M. M. . Avaliação do efeito anti-inflamatório do dimetilsulfóxido (DMSO) em cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária e submetidas à mastectomia unilateral. PUBVET (LONDRINA), 2020.