REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS SUBMETIDAS À FOTOBIOMODULAÇÃO LASER E OZONIOTERAPIA

HISTOLOGICAL EVALUATION OF SKIN WOUNDS IN RATS SUBJECTED TO LASER PHOTOBIOMODULATION AND OZONE THERAPY

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE HERIDAS CUTÁNEAS EN RATAS SOMETIDAS A FOTOBIOMODULACIÓN LÁSER Y OZONOTERAPIA

Flávia Quadros Lima[1], Antônio Márcio Marchionni[2], Beatriz Paim de Figueiredo Braitenbach[3], Bruna Carvalho Lopez Moreno[4], Sarah Souza Lima[5], Carla Barreto Cerqueira[6], Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado[7]

e737325
https://doi.org/10.47820/recima21.v7i3.7325

PUBLICADO: 03/2026

RESUMO

As terapias biomoduladoras têm sido cada vez mais utilizadas na área da saúde para estimular o reparo tecidual. Este estudo objetivou avaliar, comparativamente, os efeitos da fotobiomodulação laser, do ozônio gasoso e do óleo ozonizado sobre o reparo tecidual, por meio da análise histológica de feridas cutâneas em ratos. Quarenta ratos Wistar foram alocados randomicamente em quatro grupos de dez animais cada: Grupo controle (GC), Laser (GL), Gás Ozônio (GGO) e Óleo Ozonizado (GOO). Foram realizados ferimentos cutâneos padronizados no dorso dos animais e os grupos experimentais foram tratados por três dias consecutivos. Cinco e dez dias após a cirurgia, cinco ratos de cada grupo foram eutanasiados e foram coletadas amostras da área da ferida para processamento histológico e coloração com Hematoxilina-eosina e Sírius vermelho. Com cinco micrografias padrão de cada secção histológica, foram avaliadas celularidade do tecido de granulação, a expressão do colágeno e densidade vascular. O nível de significância foi de $p<0,05$. Dez dias após a cirurgia, constatou-se aumento da celularidade do tecido de granulação em todos os grupos, exceto no GGO ($p=0,043$). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa em relação à organização do colágeno entre o GC e o GL no 5º dia ($p=0,012$). A densidade vascular foi maior no GOO em relação aos demais grupos experimentais no 5º ($p=0,045$) e no 10º dia ($p=0,004$). Na forma de gás, o ozônio atenuou o processo inflamatório crônico, enquanto, na forma de óleo, destacou-se pelo aumento da vascularização em ambos os períodos do estudo. O grupo fotobiomodulado apresentou melhor organização do colágeno.

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Ozonioterapia. Colágeno. Inflamação.

[1] Mestre em Medicina e Saúde Humana, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil.
[2] Doutor em Laser, Professor do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil.
[3] Mestranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.
[4] Graduação em Odontologia, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil.
[5] Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.
[6] Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.
[7] Doutora em Patologia Humana, Professora Associada do Departamento de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

ISSN: 2675-6218 - RECIMA21

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

ABSTRACT
Biomodulatory therapies are becoming increasingly common in healthcare to enhance tissue repair. This study aimed to evaluate and compare the effects of laser photobiomodulation, gaseous ozone, and ozonated oil on tissue repair in skin wounds in rats, using histological analysis. Forty Wistar rats were randomly assigned to four groups of 10 animals each: Control Group (CG), Laser Group (LG), Ozone Gas Group (OGG), and Ozonated Oil Group (OOG). Standardized skin wounds were created on the backs of the animals, and the experimental groups received their respective treatments for three consecutive days. Five and ten days post-surgery, five rats from each group were euthanized, and skin samples were collected from the wound area for histological processing. The samples were stained with hematoxylin-eosin and Sirius red. Five standard micrographs of each histological section were analyzed to assess granulation tissue cellularity, collagen organization, and vascular density. A significance level of $p<0.05$ was established for statistical analysis. On the 10th day after surgery, increased granulation tissue cellularity was observed in all groups except the OGG ($p=0.043$). A statistically significant difference in collagen organization was noted between the CG and LG on the 5th day ($p=0.012$). Vascular density was higher in the OOG than in the other experimental groups on the 5th and 10th days ($p=0.045$ and $p=0.004$, respectively). In gaseous form, ozone reduced chronic inflammation, while the oil form was particularly noted for its enhanced vascularization during both study periods. The photobiomodulated group demonstrated superior collagen organization.

KEYWORDS: *Wound healing. Low-Level Light Therapy. Ozone therapy. Collagen. Inflammation.*

RESUMEN
Las terapias biomoduladoras han sido cada vez más empleadas en el ámbito de la salud para estimular la reparación tisular. El objetivo de este estudio fue evaluar comparativamente los efectos de la fotobiomodulación láser, el ozono gaseoso y el aceite ozonizado sobre la reparación tisular, mediante el análisis histológico de heridas cutáneas en ratas. Cuarenta ratas Wistar fueron asignadas aleatoriamente en cuatro grupos (n=10): Grupo Control (GC), Grupo Láser (GL), Grupo Gas Ozono (GGO) y Grupo Aceite Ozonizado (GOO). Se realizaron heridas cutáneas estandarizadas en el dorso de los animales, y los tratamientos se aplicaron durante tres días consecutivos. A los 5 y 10 días postoperatorios, cinco animales de cada grupo fueron sometidos a eutanasia y se recolectaron muestras del área lesionada para su procesamiento histológico y tinción con hematoxilina-eosina y rojo Sirius. A partir de cinco micrografías por sección histológica, se evaluaron la celularidad del tejido de granulación, la expresión de colágeno y la densidad vascular. El nivel de significancia fue $p<0,05$. A los 10 días, se observó un aumento de la celularidad del tejido de granulación en todos los grupos, excepto en el GGO ($p=0,043$). Se identificó una diferencia significativa en la organización del colágeno entre GC y GL en el día 5 ($p=0,012$). La densidad vascular fue mayor en el GOO en los días 5 ($p=0,045$) y 10 ($p=0,004$). El ozono gaseoso atenuó el proceso inflamatorio crónico, mientras que el aceite ozonizado promovió una mayor vascularización. El grupo sometido a fotobiomodulación presentó una mejor organización del colágeno.

PALABRAS CLAVE*: Cicatrización de Heridas. Terapia por Luz de Baja Intensidad. Ozonoterapia. Colágeno. Inflamación.*

1. INTRODUÇÃO

As terapias biomoduladoras podem ser entendidas como um conjunto de abordagens não invasivas capazes de modular a resposta biológica das células e tecidos, de forma a favorecer processos fisiológicos e patológicos, entre os quais destaca-se a cicatrização de ferimentos. A fotobiomodulação laser e o uso do ozônio medicinal são alguns desses métodos que têm sido

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

estudados devido ao seu potencial benefício para o reparo tecidual, e é de grande interesse para a área da Saúde a obtenção de protocolos padronizados para aplicação destas terapias na prática clínica.[1,2]

Têm sido relatado na literatura que a fotobiomodulação laser, com comprimento de onda que se situa no espectro de luz visível, pode interferir positivamente no processo cicatricial através do aumento da biossíntese de ATP, proliferação de linfócitos e aumento da atividade funcional e do número de fibroblastos.[3,4] Tais efeitos são interdependentes do tipo de tecido tratado, da densidade de energia, da potência do laser e do tempo e dos intervalos de aplicação para cada condição clínica.[5]

Adicionalmente, tem sido documentado o uso crescente da ozonioterapia. O ozônio é um componente da atmosfera terrestre e sua molécula é composta por três átomos de oxigênio, com forte ação oxidante.[6] A ozonioterapia exerce ação terapêutica sobre os tecidos celulares, pois ativa os mecanismos de síntese proteica, aumentando a quantidade de ribossomos e a atividade mitocondrial das células. Essas mudanças, que ocorrem em nível celular, explicam a elevação da atividade funcional e o potencial de regeneração de tecidos e órgãos submetidos a essa modalidade terapêutica.[7]

A despeito da utilização das terapias biomoduladoras já citadas, estudos comparativos sobre os efeitos da fotobiomodulação laser e da ozonioterapia no reparo tecidual ainda têm sido pouco explorados na literatura.[8-10] Em particular, os poucos estudos que contemplaram o uso destas modalidades terapêuticas para fins de biomodular e/ou acelerar o processo cicatricial demonstraram seus efeitos positivos em diferentes tecidos, em especial no reparo ósseo e no tecido nervoso.[11,12] Não está claramente estabelecido, até o momento, na literatura, se a fotobiomodulação laser e a ozonioterapia exercem efeitos comparáveis ou distintos sobre os parâmetros histológicos da fase proliferativa da cicatrização cutânea.

O presente estudo teve por objetivo avaliar, comparativamente, a influência da fotobiomodulação por laser e da ozonioterapia na fase proliferativa do reparo tecidual de feridas cirúrgicas padronizadas em pele de ratos, por meio de análise histomorfométrica. Mais especificamente, avaliar, de forma semiquantitativa, o efeito da fotobiomodulação laser, do óleo ozonizado e do gás ozônio sobre o infiltrado de células inflamatórias monomorfonucleares e sobre o grau da inflamação, bem como sobre o padrão de organização das fibras colágenas e a densidade vascular no leito do ferimento, nos diferentes grupos experimentais.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA). Foi registrado sob o número de protocolo 67/2019.

2.2. Amostra

Durante o experimento, os animais foram mantidos na Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), em condições sanitárias de biotério convencional desta Instituição. O acondicionamento dos animais foi realizado em gaiolas individuais, etiquetadas, com chão coberto com maravalha. Os ratos foram mantidos em condições padrão de temperatura (22-25 °C) e umidade relativa (50-52%), com ciclos de luz e escuro de 12 h, e expostos à luminosidade artificial por 12 horas por dia. A alimentação dos ratos foi realizada com ração balanceada Nuvilab® (Suprilab) e água *ad libitum*. Foram adotados cuidados específicos quanto à limpeza e ao ambiente protegido de estímulos auditivos para evitar o estresse.

Foi realizado cálculo amostral para determinar o número de animais necessários para o estudo. Nesse aspecto, adotaram-se os critérios estabelecidos por Eckelman et al.[13] e Scheibe[14]. Adotou-se como parâmetro uma diferença da área de colágeno da ordem de 30% entre os grupos teste e o controle, com nível de significância de $p<0,05$, e coeficiente de variação (CV) de 20% para ratos Wistar. Desta forma, o número de ratos foi definido em 10 para cada grupo experimental.

A amostra contemplou 40 animais e foi estabelecido como critérios de inclusão ratos Wistar machos com peso entre 150 e 200 g, provenientes do biotério da Faculdade Adventista da Bahia. Como critérios de exclusão, ficaram fora da amostra os animais que apresentassem feridas, doenças crônicas e/ou defeitos cutâneos. Os animais foram alocados por sorteio do número de registro no biotério, em 4 grupos de 10 ratos cada, os quais foram sacrificados no 5° e 10° dias após o início dos testes, correspondentes à fase proliferativa do reparo. Em cada um desses períodos, 5 ratos de cada grupo experimental foram sacrificados. O Grupo 1 correspondeu ao Grupo Controle (GC) e recebeu aplicação tópica de solução salina; o Grupo 2, denominado Grupo Laser (GL), foi submetido à fotobiomodulação laser local; o Grupo 3, chamado de Grupo Ozônio (GO), recebeu terapia com ozônio gasoso insuflado na borda da lesão; e o Grupo 4, Óleo Ozonizado (GOO) foi tratado com óleo na superfície do ferimento.

2.3. Procedimentos cirúrgicos e utilização das terapias biomoduladoras

Seguindo os protocolos preconizados para experimentos com animais descrito por Damy et al.[15], os animais foram submetidos à pesagem, anestesiados com cloridrato de quetamina 10%

ISSN: 2675-6218 - RECIMA21
Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

(Dopalen®, São Paulo, Brasil) 75 mg/ml e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan, São Paulo, Brasil) 5 mg/ml, com a dosagem de 2mg/kg e 3mg/kg, respectivamente. Em seguida, efetuou-se a tricotomia dorsal. Foi realizada uma incisão circular na região dorsal com o auxílio de um bisturi circular metálico, *punch*, (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha) com 6mm de diâmetro para a obtenção de uma ferida uniforme e padronizada, a qual foi executada por um único operador devidamente calibrado, de acordo com o modelo descrito por Medrado et al.[16] e ilustrado por Braitenbach et al.[17].

Os ferimentos cutâneos dos ratos do Grupo Laser (GL) foram submetidos a 4 aplicações pontuais de 1 J/cm^2, nos vértices correspondentes às linhas diametrais opostas nos bordos da ferida com dosimetria total de 4 J/cm^2, por dia de aplicação. Utilizou-se um aparelho semicondutor de laser de arseneto de alumínio e gálio (AsAlGa, 9 mW, 670 nm, Laser de diodo de 0,031 W/cm^2), com emissão contínua e área da ponta ativa de 0,28 cm^2 (Laser VR-KC-610- Dentoflex, Brasil). A dosimetria final foi de 12 J/cm^2 pois os ratos foram irradiados em 3 dias consecutivos após o procedimento cirúrgico para a realização do ferimento cutâneo.

O ozônio foi produzido pelo gerador Philozon® (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil) na concentração de 13µg/ml de ozônio, a partir de oxigênio medicinal, com fluxo constante de 1L/min. A mistura com oxigênio foi capturada em uma seringa de 5 ml e, através de uma agulha de insulina, o gás foi insuflado com volume de 1ml, de forma uniforme, em 4 pontos correspondentes aos vértices diametrais nos bordos da lesão, nos mesmos moldes descritos para a fotobiomodulação laser, totalizando 52µg de O_3. Este procedimento também foi repetido por três dias consecutivos, após a cirurgia.

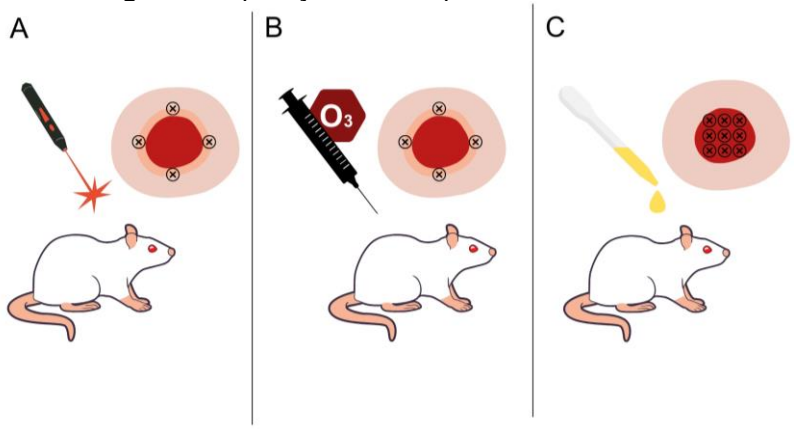
Foi administrado óleo de girassol ozonizado a 100% (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil). Aplicou-se um volume de 50µl, de modo a cobrir toda a superfície da lesão. Essa aplicação tópica foi realizada por 3 dias consecutivos, da mesma forma descrita para os grupos anteriores.

Os animais foram submetidos às terapias biomoduladoras nos dias 1, 2 e 3 do estudo. O GC recebeu 50µl de solução salina a 9% pipetada na superfície da lesão, por 3 dias consecutivos, e apenas contato com a seringa de aplicação do gás ozônio e com a ponta ativa do laser desligado. Cada grupo, com 10 animais, teve metade dos espécimes sacrificados no 5º dia e a outra metade no 10º dia. A Figura 1 ilustra os procedimentos realizados em cada grupo experimental.

ISSN: 2675-6218 - RECIMA21
Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

Figura 1. Aplicação das terapias biomoduladoras



(A) representa o GL; (B) representa o GGO; e (C) representa o GOO. O (x) corresponde ao local de aplicação da terapia biomoduladora proposta para cada grupo.
Fonte: Autoria própria.

2.4. Morte dos animais

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

2.5. Processamento histológico

Após a confirmação da morte, foi removida uma porção de tecido do dorso dos ratos que abrangia a ferida cirúrgica. O espécime foi fixado por um período mínimo de 48 horas, em solução de formol 10%, tamponado. Os fragmentos de pele contendo a lesão foram submetidos a cortes histológicos de 4 µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina para avaliação das variáveis infiltrado monomorfonuclear, intensidade da inflamação crônica e densidade vascular. As secções teciduais também foram coradas com Sírius vermelho para analisar a neocolagênese.

2.6. Análise histológica

A captura das imagens das secções teciduais submetidas às colorações descritas foi realizada com o software Motic Images Advanced 3.0® (Motic China Group CO. LTD), do Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Foi estabelecida uma área padrão para a análise de todos os casos, a saber: 13107,2 pixels. Cinco imagens padrão, correspondentes a cada secção tecidual, foram capturadas com a dimensão estabelecida para análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório monomorfonuclear e de fibroblastos, da densidade vascular e da neocolagênese. Essas áreas foram documentadas na derme subjacente à localização da úlcera cutânea.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

Com relação à celularidade do tecido de granulação, quando os núcleos de células monomorfonucleares e fibroblastos estavam presentes em percentual igual ou superior a 75% na secção analisada, o grau foi considerado muito intenso (4); entre 50 e 75%, intenso (3); de 25 a 50% de células do tecido, grau moderado (2); menor ou igual a 25%, leve (1) e 0 para ausente. A densidade vascular foi categorizada de acordo com os seguintes escores: leve (1) para até 10 vasos identificados, moderado (2) para 11 a 20 vasos, intenso (3) para 21 a 50 vasos e muito intenso (4) para número superior ao citado. Apenas vasos sanguíneos com revestimento endotelial íntegro que evidenciassem a presença de pelo menos duas células endoteliais foram considerados.

A biossíntese do colágeno foi avaliada de acordo com os critérios estabelecidos por Alvarenga et al.[18] onde as fibras colágenas foram classificadas através de três escores: 1 para fibras colágenas finas, delicadas, frouxamente organizadas vistas em toda a área da ferida; 2 para fibras colágenas finas, delicadas frouxamente organizadas em algumas áreas e mais espessas e grossas em outras áreas da ferida e 3 para fibras colágenas espessas, grossas e densamente organizadas vistas em toda a área da ferida.

Cada área foi capturada com aumento de 40X e salva em formato JPEG. Todas as análises foram realizadas às cegas, por três examinadores previamente calibrados (ARAPM, FQL e BCLM). O índice de Cohen Kappa foi utilizado para avaliar a concordância entre os examinadores e apresentou valor de 0,92.

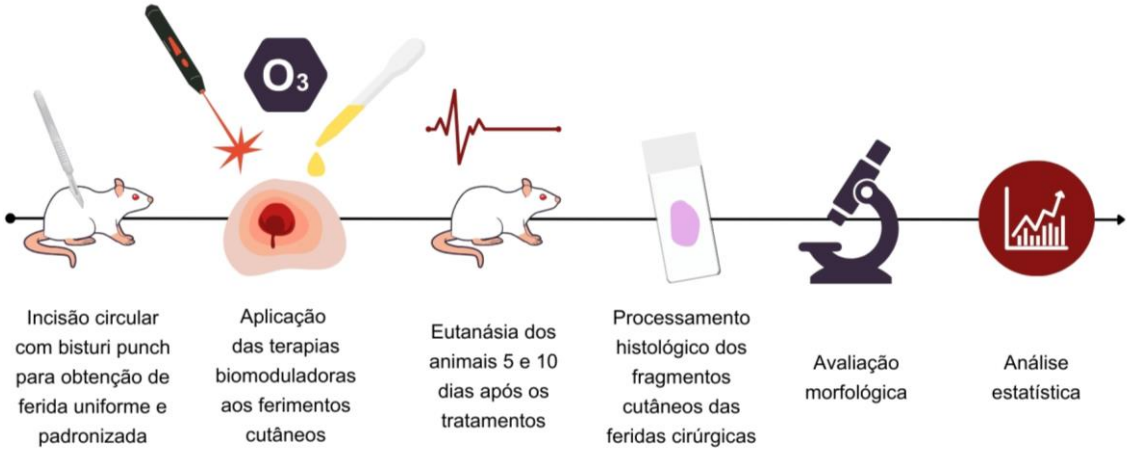
2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados no software R (versão 4.2.0), no qual foi realizada a análise descritiva (mediana e quartis) para identificar as características gerais e específicas da amostra estudada. Para verificar a normalidade da distribuição dos dados, utilizaram-se o teste de Shapiro-Wilk e a análise da simetria e do achatamento da curva de distribuição. Para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos de interesse, foram utilizados o teste de Mann-Whitney e o de Kruskal-Wallis não-paramétricos, seguidos pelo teste a posteriori de Dunn. O nível de significância estabelecido para este trabalho foi de 5%. A Figura 2 ilustra todo o delineamento do estudo experimental.

ISSN: 2675-6218 - RECIMA21
Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

Figura 2 - Linha do tempo da metodologia do estudo



Fonte: Autoria própria.

3. RESULTADOS

A Tabela 1 ilustra a comparação entre os dois dias de análise em cada grupo experimental, separadamente. No GC, observou-se que, no 5º dia, o tecido de granulação composto por infiltrado inflamatório monomorfonuclear e fibroblastos foi intenso, e no 10º dia, muito intenso (p=0,008). Numerosas células monomorfonucleares foram observadas em meio ao processo de fibroplasia em curso. No tocante ao padrão organizacional do colágeno, houve diferença estatisticamente significativa, pois, no segundo período de estudo, as secções histológicas já apresentavam áreas com fibras delicadas e outras com feixes mais organizados, o que é representativo do grau 2 (p=0,008).

Em relação ao GL, não houve diferença significativa entre os períodos avaliados nas três variáveis descritas (p>0,05).

No grupo GGO, houve um aumento significativo no número de vasos na derme, de 5 para 10 dias do estudo, o qual evoluiu de leve para moderado (p=0,032).

O grupo GOO, evidenciou aumento do grau da celularidade do tecido de granulação de intensa para muito intensa. Com relação ao padrão organizacional do colágeno, embora houvesse aumento de feixes colagênicos mais espessos e organizados em todas as secções histológicas, essa diferença entre os períodos não foi significativa (p>0,05). Aspectos semelhantes foram observados no tocante à densidade vascular, que passou de moderada a intensa do 5º para o 10º dia (p>0,05).

ISSN: 2675-6218 - RECIMA21
Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

Tabela 1. Análise semiquantitativa intragrupos das variáveis celularidade do tecido de granulação, colágeno e densidade vascular nos diferentes grupos experimentais, em 5 e 10 dias. Hematoxilina-eosina e Sírius vermelho, 400X

Variável	GC		GL		GGO		GOO	
	Med (q1-q3)							
	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias
Celularidade do tecido de granulação	3(2,5-3)	4(4-4)	3(3-3,5)	4(3,5-4)	3(3-3)	3(3-3,5)	3(3-3)	4(3,5-4)
	0,008*		0,151		0,690		0,063	
Colágeno	1(1-1)	2(2-2,5)	2(2-2)	3(2-3)	2(1,5-2)	2(2-2)	1,5(1-2)	2(2-3)
	0,008*		0,151		0,690		0,111	
Densidade vascular	1(1-1,5)	1(1-2)	1(1-2)	1(1-1,5)	1(1-1,5)	2(2-2,5)	2(2-2,75)	3(2,5-3)
	0,069		0,690		0,032*		0,190	

*p-valor<0,05

Na análise intergrupos, no quinto dia após o sacrifício, observou-se a presença de tecido de granulação com celularidade de grau intenso em todos os grupos experimentais. No 10º dia, todos os grupos evidenciaram aumento desta variável de intenso para muito intenso, exceto GGO e esta diferença foi estatisticamente significativa (p=0,043). A análise do padrão organizacional das fibras colágenas no 5º dia evidenciou que GC apresentou fibras mais delicadas, frouxamente organizadas, enquanto GL, GGO e GOO já exibiam fibras colágenas mais espessas e grossas em algumas áreas das secções analisadas. Contudo, esta diferença foi significativa apenas entre GC e GL (p=0,012). A formação de novos vasos sanguíneos presentes no tecido de granulação existente na derme dos animais, representada pela variável densidade vascular, foi estatisticamente significativa no GOO tanto no 5º (p=0,045) quanto no 10º dia (p=0,004), em relação ao GC, GL e GGO (Tabela 2); (Figuras 3 e 4).

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

Tabela 2. Análise semiquantitativa intergrupos das variáveis celularidade do tecido de granulação, colágeno e densidade vascular nos diferentes grupos experimentais, nos dias 5 e 10 do reparo cutâneo. Hematoxilina-eosina e Sírius vermelho, 400X

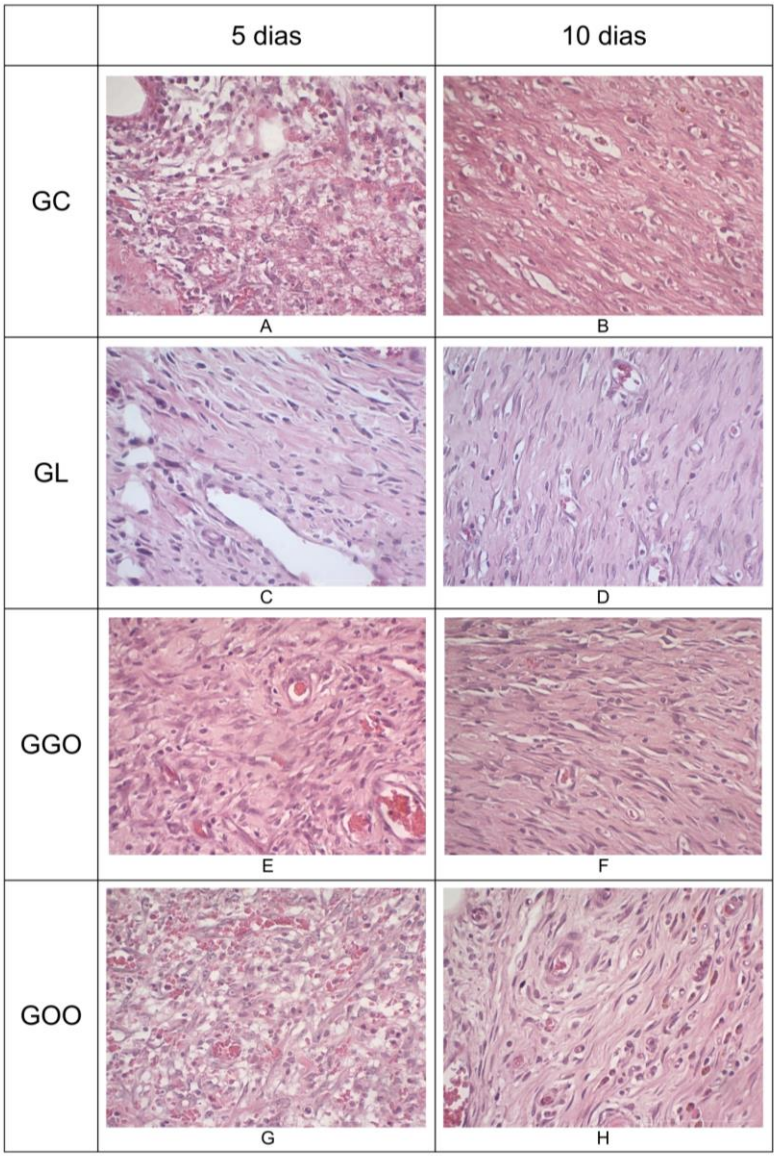
Variável	Med(q1-q3)							
	5 dias				10 dias			
	GC	GL	GGO	GOO	GC	GL	GGO	GOO
Celularidade do tecido de granulação	3(2,5-3)	3(3-3,5)	3(3-3)	3(3-3)	4(4-4)	4(3,5-4)	3(3-3,5)	4(3,5-4)
		0,308				0,043*[1]		
Colágeno	1(1-1)	2(2-2)	2(1,5-2)	1,5(1-2)	2(2-2,5)	3(2-3)	2(2-2)	2(2-3)
		0,012*[2]				0,210		
Densidade vascular	1(1-1,5)	1(1-2)	1(1-1,5)	2(2-2,75)	1(1-2)	1(1-1,5)	2(2-2,5)	3(2,5-3)
		0,045*[3]				0,004*[3]		

*[1] Estatisticamente significativa entre GGO x GC; GGO x GL; GGO x GOO
*[2] Estatisticamente significativa entre GC x GL
*[3] Estatisticamente significativa entre GOO x GC; GOO x GL; GOO x GGO

ISSN: 2675-6218 - RECIMA21
Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

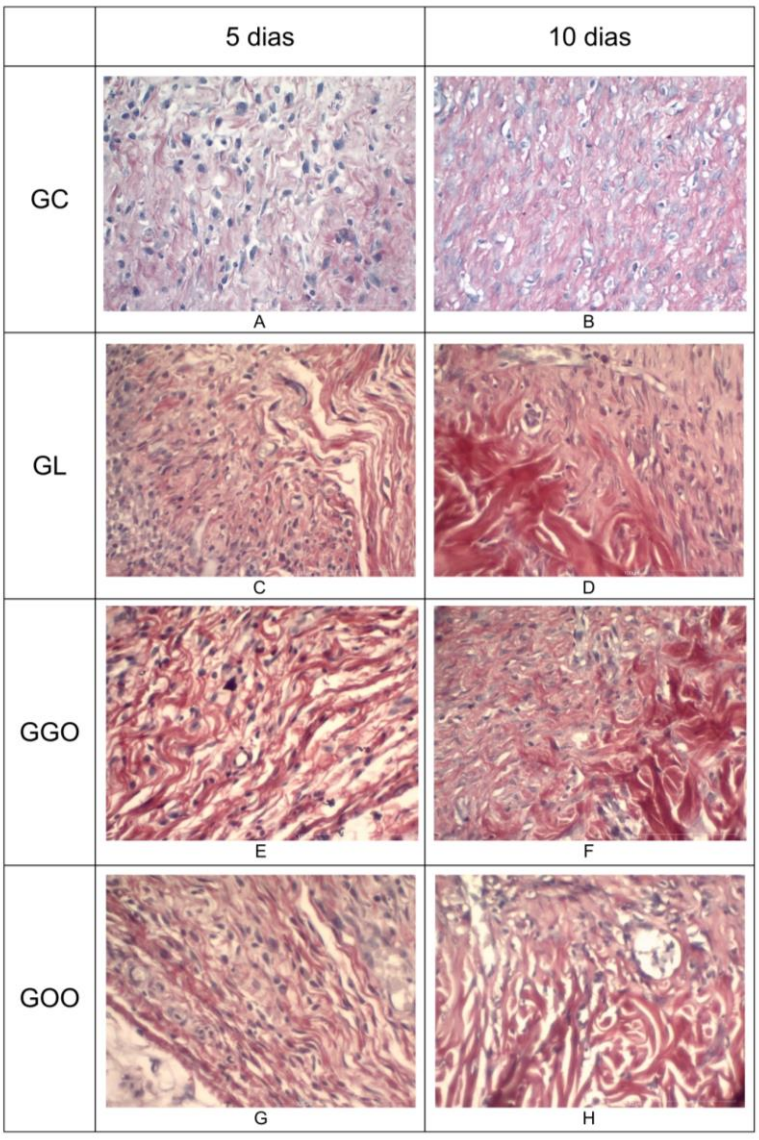
Figura 3. Fotomicrografias de secções de pele (HE) obtidas na objetiva de 40x das áreas dos ferimentos cutâneos padronizados, que ilustram as características histomorfológicas nos grupos em 5 e 10 dias. Nota-se que no 5º dia, os grupos GC (A), GL (C), GGO (E) e GOO (G) evidenciaram presença de infiltrado inflamatório monomorfonuclear, característico de inflamação crônica difusa com intensidade que variou de intenso a muito intenso e inúmeros vasos sanguíneos (setas). No GC ainda foram visualizadas áreas de edema intersticial. No período de 10 dias, GC (B), GL (D), GGO (F) e GOO (H) apresentaram características compatíveis com etapas mais avançadas do processo de cicatrização, área maior de fibroplasia. GOO evidenciou maior número de vasos nos dois períodos do estudo



ISSN: 2675-6218 - RECIMA21
Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

Figura 4 - Fotomicrografias de secções de pele (Sírius vermelho) obtidas na objetiva de 40x das regiões dos ferimentos cutâneos padronizados, que ilustram as características histomorfológicas nos grupos com 5 e 10 dias. Nota-se que no 5º dia, o GC (A) apresentou fibras mais delicadas, frouxamente organizadas e GL (C), GGO (E) e GOO (G), já exibiam fibras colágenas mais espessas e grossas em algumas áreas das secções analisadas. Aos dez dias, o padrão organizacional das fibras colágenas foi semelhante nos grupos GC (B), GGO (F) e GOO (H), à exceção do GL (D) que exibiu fibras espessas, grossas e densamente organizadas



4. DISCUSSÃO

Este estudo experimental objetivou avaliar comparativamente as alterações teciduais inerentes ao reparo tecidual sob a influência de três terapias biomoduladoras, com ênfase para a fase proliferativa, caracterizada pelo aumento das células no tecido de granulação, da área representada pelo colágeno, e da neoangiogênese.

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

Sabe-se que essa fase do reparo, normalmente se inicia no 3° dia após a lesão, e pode se estender por até duas semanas.[19] Dessa forma, a avaliação das variáveis descritas nos períodos de 5 e 10 dias no presente estudo, possibilitou compreender melhor de que modo as terapias com ozônio e laser modularam a cicatrização cutânea de ratos.

As terapias biomoduladoras utilizadas já têm sido extensivamente investigadas na literatura, contudo, até o momento, poucos estudos contemplaram uma análise dos efeitos da fotobiomodulação laser em comparação ao ozônio, inclusive em modelos experimentais. O modelo experimental clássico de cicatrização cutânea adotado no presente estudo, permitiu maior controle de variáveis externas e uma boa reprodutibilidade da fase proliferativa do reparo, além de apresentar fácil exequibilidade. Na literatura, há outros estudos realizados nos mesmos moldes desta pesquisa.[20-22] Adicionalmente, alguns estudos têm demonstrado que tanto a fotobiomodulação por laser quanto a ozonioterapia podem modular diferentes fases do reparo tecidual.[23-26]

No presente estudo, a análise intergrupos, revelou que apenas o GGO não apresentou aumento da celularidade do tecido de granulação como os demais grupos no 10º dia do estudo. Apesar da escassez de estudos comparativos entre diferentes vias de administração do ozônio no contexto da cicatrização cutânea, é possível sugerir que o ozônio pode ter exercido um efeito anti-inflamatório mais prolongado no tecido em formação, com impacto na sua celularidade. De fato, Cardoso et al.[27] e Soares et al.[28] também relataram resultados semelhantes com o uso do gás ozônio. O primeiro realizou um estudo dos efeitos do ozônio sistêmico intraperitoneal em feridas cutâneas de ratos, e constatou que o grupo que recebeu a maior dosagem de ozônio (dose de 1,0 mg/kg/pc e concentração de 50 µg/ml de O_3) apresentou aspectos histológicos consistentes com reparo tecidual mais acelerado, maior redução do infiltrado inflamatório e ativação da formação de colágeno, em comparação aos demais grupos. Já a pesquisa conduzida por Soares et al.[28] teve como objetivo analisar o padrão de cicatrização de ferimentos em ratos tratados com ozônio por meio de injeção subcutânea. As feridas que receberam ozonioterapia exibiram tecido de granulação com número reduzido de células inflamatórias, maior celularidade dérmica e intensa deposição de colágeno. O fator de crescimento fibroblástico básico 2 (FGF2), a densidade microvascular e a quantidade de miofibroblastos foram significativamente maiores no grupo ozônio em comparação ao controle.

Contudo, há que se salientar que o presente estudo apresenta uma limitação, pois não avaliou cada tipo celular integrante do tecido de granulação de forma isolada. Dessa forma, resultados divergentes têm sido relatados na literatura, na qual se observou que o ozônio foi capaz de estimular a atividade fibroblástica por meio de aumento na expressão de proteínas, como vimentina e fibronectina.[29,30,26] Em nosso estudo, entre os grupos tratados, apenas os grupos GL e

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

GOO exibiram aumento da celularidade do tecido de granulação, embora sem significância estatística, enquanto a terapia em gás não apresentou resultados semelhantes.

Em contrapartida, os óleos ozonizados retêm reativos do ozônio na forma de ozonídeos e peróxidos lipídicos, que liberam espécies reativas de modo mais lento e sustentado no leito da ferida, o que pode implicar maior estabilidade em relação ao gás.[31] Neste sentido, Rafiei et al.[32] avaliaram as propriedades terapêuticas do ozônio na cicatrização de queimaduras de terceiro grau em ratos, por meio de diferentes vias de administração: água, óleo, gás tópico e gás sistêmico. Foram analisados, nos dias 4, 8 e 14 do experimento, a área da ferida, a presença de células inflamatórias, a angiogênese e a formação de tecido de granulação. Os autores constataram que a utilização do ozônio em forma líquida (água e óleo) otimizou significativamente mais o reparo tecidual, quando comparada aos demais grupos. O grupo tratado com o óleo apresentou uma maior formação de vasos sanguíneos e de tecido de granulação no 4° dia, o que é consistente com os achados do presente estudo, onde também foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o GOO e os outros grupos experimentais, e no GGO, ao se avaliar a variável densidade vascular em ambos os períodos analisados.

Ainda em relação ao resultado do aumento da densidade vascular observado nos grupos submetidos à ozonioterapia sob a forma de gás e óleo, têm sido documentado na literatura que o ozônio pode induzir um estresse oxidativo moderado no tecido, e dessa forma, regular positivamente o fator induzível por hipóxia alfa (HIF-1α), além de estimular a liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador beta (TGF-β), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).[33,34,25] Dessa forma, o ozônio poderia promover um aumento da vascularização na área lesionada, o que favorece o suprimento de oxigênio e nutrientes à região, bem como o recrutamento de células-tronco hematopoéticas, que participam da regulação da resposta imune e inflamatória. Essas células estão envolvidas na secreção de citocinas como IL-10, TGF-β e PGE2, na indução de linfócitos T reguladores e na polarização de macrófagos para o fenótipo M2, o que contribui para o controle de reações inflamatórias exacerbadas e para a progressão ordenada do reparo tecidual.[35,36]

No que se refere ao padrão de organização das fibras colágenas, a análise dessa variável intergrupos evidenciou uma diferença estatisticamente significativa apenas entre GC e GL ao 5º dia, ao passo que os grupos tratados com ozônio também mostraram uma evolução de fibras finas e delicadas para fibras mais espessas. O método de análise das fibras colágenas, primeiramente descrito por Alvarenga et al.[18], foi útil para avaliar não apenas o grau de presença de colágeno na MEC, mas também o padrão organizacional dessas fibras, e foi possível identificar um arranjo mais organizado no grupo tratado com fotobiomodulação. O estudo de Castro et al.[37] ratifica tais resultados. Os autores realizaram enxerto de pele e terapia com fotobiomodulação, imediatamente

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

após o procedimento e a cada 24h, na área correspondente à lesão em ratos. No 7° dia do pós-operatório, foi evidenciado que os animais submetidos à terapia apresentaram não só maior quantidade de fibras colágenas ($p<0,05$), mas também um melhor padrão organizacional do colágeno em comparação aos controles. Em outro estudo com ratos, Oliveira et al.[38], por meio de análise histológica e macroscópica do reparo de ferimentos cutâneos tratados com fotobiomodulação em doses fixas e crescentes, também demonstraram que ambos os grupos experimentais apresentaram maior deposição de colágeno. O grupo que recebeu doses crescentes de laser (1 J/cm^2, 3 J/cm^2 e 5 J/cm^2) apresentou o maior teor de colágeno total ao final de 10 dias, em comparação com o grupo que recebeu a dosagem fixa de 3 J/cm^2. Fortuna et al.[21], documentaram achados semelhantes, com o objetivo investigar os efeitos da fotobiomodulação sobre a angiogênese e fibroplasia durante a remodelação tecidual, 14, 21, 28 e 35 dias após a lesão, eles observaram que a expressão de colágeno foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo laser em comparação ao grupo controle nos dias 14 e 21 do estudo. Os resultados do nosso estudo reforçam a evidência de que a fotobiomodulação modula a biossíntese do colágeno, tanto quantitativamente quanto qualitativamente.

Em uma revisão sistemática da literatura, desenvolvida por Andrade et al.39, foram identificados cinco estudos em animais que, assim como a presente pesquisa, compararam os efeitos da fotobiomodulação laser e da ozonioterapia. Entretanto, nenhum dos estudos citados avaliou a ação destas terapias biomoduladoras no reparo cutâneo. Os estudos de Kazancioglu et al.[9] e de Alan et al.[8] analisaram o efeito das terapias biomoduladoras na cicatrização óssea. No primeiro, as terapias foram aplicadas três vezes por semana, durante duas semanas, em defeitos ósseos críticos da calvária de ratos, e a amostra para análise foi coletada no dia 30 após a lesão. O ozônio foi aplicado com uma sonda sobre a área do defeito, na concentração de 80%, por 120 segundos, e, em relação à fotobiomodulação laser, utilizou-se um laser de diodo por 120 segundos. Os grupos tratados com o laser e com o ozônio demonstraram efeito estatisticamente superior no tocante à neoformação óssea, em comparação com o grupo controle ($p<0,05$). No segundo estudo, os autores reproduziram experimentalmente defeitos ósseos em fêmures de ratos. Foi utilizado um laser de diodo semicondutor de As-Al-Ga, três vezes por semana, em dias alternados, durante quatro semanas. O ozônio foi administrado topicamente, com concentração de 80%, por meio de uma sonda, durante 30 segundos. Foi realizada análise histomorfométrica em dois períodos distintos, correspondentes às 4 e 8 semanas. Foram evidenciadas áreas maiores de osso neoformado e um maior número de células osteocalcina-positivas nos grupos tratados com fotobiomodulação laser e ozônio, em relação aos animais controle, especialmente na 8ª semana do período pós-operatório ($p<0,05$).

Já no contexto do potencial regenerativo do tecido nervoso, os estudos de Yucesoy et al.[10] e Yuca et al.[11] avaliaram o efeito da fotobiomodulação com laser e da ozonioterapia na

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

regeneração de lesão do nervo facial em ratos. Foi utilizada, no primeiro estudo, a fotobiomodulação por LED aplicada ao longo do trajeto do nervo por 5 minutos diariamente durante 21 dias. O gás ozônio também foi aplicado por 21 dias, por meio de uma sonda, com concentração de 75% por 60 segundos. Já no estudo de Yuca et al.[11], os autores utilizaram fotobiomodulação laser por LED, por 32 segundos, durante 21 dias consecutivos, e a ozonioterapia foi administrada na concentração de 2,5% de O_3 e 97,5% de O_2 por via insuflação peritoneal, por 21 dias. Em ambos os estudos, observou-se que os animais tratados com as duas terapias exibiram um padrão organizacional mais favorável dos feixes nervosos correspondentes ao nervo facial, quando comparados aos controles ($p<0,05$).

O estudo que mais se aproximou do modelo experimental utilizado foi o de Bayer et al.[12], em que os autores avaliaram, comparativamente, a ação da fotobiomodulação laser e da ozonioterapia em úlceras de mucosite oral induzidas experimentalmente por meio da administração intraperitoneal em ratos. Foi identificada maior quantidade de fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e de PDGF no grupo tratado com laser, e essa diferença foi estatisticamente significativa. Outro estudo, desenvolvido por Özalp et al.[2], também avaliou, comparativamente, a utilização do laser e do ozônio na cicatrização de ferimentos na mucosa oral de ratos, e ambos os grupos experimentais apresentaram escore reduzido de inflamação aguda em relação ao controle ($p<0,05$), porém sem diferenças significativas entre o grupo laser e o grupo ozônio ($p>0,05$). Embora a pele e a mucosa oral sejam geralmente semelhantes quanto à presença de biomoléculas ou em sua morfologia e funções, existem diferenças nas condições homeostáticas que devem ser levadas em consideração ao comparar o processo de cicatrização em ambos os tipos de tecidos.[40]

Uma das limitações do presente estudo encontra-se no fato de se deter na histomorfometria e a não utilização de técnicas imunohistoquímicas para a análise da formação de novos vasos sanguíneos, que seriam capazes de aumentar a sensibilidade e a especificidade dos resultados obtidos. Na contagem dos vasos sanguíneos nas secções coradas com hematoxilina-eosina, foi necessário ater-se aos aspectos morfológicos que permitiram a identificação de pequenos vasos, como a presença de revestimento íntegro do epitélio pavimentoso simples na parede vascular e possível presença ou ausência de eritrócitos no lúmen. Outro aspecto digno de nota é que o presente estudo se detém a analisar o reparo apenas na fase proliferativa. Os autores encorajam a realização de mais estudos para avaliar a resposta inflamatória inicial frente à agressão, assim como as etapas mais tardias do reparo cutâneo que incluam a completa re-epitelização e remodelamento dérmico.

A despeito dos resultados favoráveis relacionados ao uso das terapias biomoduladoras discutidos, existem resultados divergentes na literatura, em especial no tocante às variáveis histológicas relacionadas ao processo inflamatório[41,42] e área do colágeno.[43,26]

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

É importante, nesse sentido, ressaltar a existência de uma ampla variedade de técnicas de avaliação, assim como de variáveis histológicas e períodos de análise. A busca por protocolos padronizados, em especial da ozonioterapia, ainda pode ser considerada relevante e deve ser explorada em outras pesquisas, tanto de caráter experimental, como envolvendo seres humanos. Além desse aspecto, os nossos resultados também parecem indicar que a fotobiomodulação laser e a ozonioterapia, em diferentes modalidades, podem modular o reparo da lesão de diferentes formas, o que sugere que a ativação de vias de sinalização celulares/moleculares seja deflagrada por mecanismos de ação distintos.

5. CONSIDERAÇÕES

A aplicação de ozônio em forma gasosa atenuou o processo inflamatório crônico em comparação com os demais grupos do estudo. O óleo ozonizado se destacou pela promoção do aumento da vascularização em ambos os períodos do estudo, enquanto o grupo experimental fotobiomodulado apresentou melhor organização do colágeno.

REFERÊNCIAS

1. Cerqueira CBS, Dantas JBL, Souza BGS, Carvalho MA, Medrado ARAP, Matos JBTL. Tissue repair under the influence of plasma jet and other biomodulator therapies - state of the art. Res Soc Dev. 2022;11(12):e470111234870. Available from: https://doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34870. doi:10.33448/rsd-v11i12.34870

2. Özalp ÖA, Sindel MA, Altay IH, Özbudak B, Bilgin B, Kocabalkan B, et al. Comparative evaluation of the efficacy of ozone therapy and low level laser therapy on oral mucosal wound healing in rat experimental model. J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2022;123(6):e670-e674. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jormas.2022.03.018. doi: 10.1016/j.jormas.2022.03.018

3. Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, Silva-Lalucci MPP, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018;21:294-305. Available from: doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.015

4. Besser M, Schaeler L, Plattfaut I, Brill FHH, Kampe A, Geffken M, et al. Pulsed low-intensity laser treatment stimulates wound healing without enhancing biofilm development in vitro. J Photochem Photobiol B. 2022;233:112504. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112504. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112504

5. de Castro JR, da Silva Pereira F, Chen L, Arana-Chavez VE, Ballester RY, DiPietro LA. Improvement of full-thickness rat skin wounds by photobiomodulation therapy (PBMT): A dosimetric study. J Photochem Photobiol B. 2020;206:111850. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111850. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111850

6. Hänninen K. Contribution of excited ozone and oxygen molecules to the formation of the stratospheric ozone layer. Environ Ecol Res. 2019;7(3):121-134. Available from: https://www.hrpub.org/journals/article_info.php?aid=7920. doi: 10.13189/eer.2019.070302

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

7. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan AS. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. Med Gas Res. 2017;7(3):212-219. Available from: https://doi.org/10.4103/2045-9912.215752. doi: 10.4103/2045-9912.215752

8. Alan H, Vardi N, Özgür C, Hüseyin A, Yolcu Ü, Doğan DÖ. Comparison of the effects of low-level laser therapy and ozone therapy on bone healing. J Craniofac Surg. 2015;26(5):e396-e400. Available from: https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000001871. doi: 10.1097/SCS.0000000000001871

9. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. J Craniofac Surg. 2013;24(6):2141-2146. Available from: https://doi.org/10.1097/scs.0b013e3182a244ae. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182a244ae

10. Yucesoy T, Kutuk N, Canpolat DG, Alkan A. Comparison of ozone and photobiomodulation therapies on mental nerve injury in rats. J Oral Maxillofac Surg. 2017;75(11):2323-2332. Available from: https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.04.016. doi: 10.1016/j.joms.2017.04.016

11. Yuca Y, Yucesoy T, Tok OE, Alkan A. The efficiency of ozone therapy and low-level laser therapy in rat facial nerve injury. J Craniomaxillofac Surg. 2020;48(3):308-314. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jcms.2020.01.017. doi: 10.1016/j.jcms.2020.01.017

12. Bayer S, Kazancioglu HO, Acar AH, Demirtas N, Kandas NO. Comparison of laser and ozone treatments on oral mucositis in an experimental model. Lasers Med Sci. 2017;32(3):673-677. Available from: https://doi.org/10.1007/s10103-017-2166-1. doi: 10.1007/s10103-017-2166-1

13. Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number of animals for each experiment. Nucl Med Biol. 2007;34(3):229-232. Available from: https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.01.005. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2007.01.005

14. Scheibe PO. Number of samples — hypothesis testing. Nucl Med Biol. 2008;35(1):3-9. Available from: https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.10.006. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2007.10.006

15. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, de Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal: aplicações em cirurgia experimental. Rev Assoc Med Bras. 2010;56(1):103-111. Available from: https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000100024. doi:10.1590/S0104-42302010000100024

16. Medrado AR, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. Lasers Surg Med. 2003;32(3):239-244. Available from: https://doi.org/10.1002/lsm.10126. doi: 10.1002/lsm.10126

17. Braitenbach BPF, Cerqueira CBS, Lima SS, Hegouet IC, Moreno BCL, Medrado ARAP. Effects of photobiomodulation on adipocytic infiltration in sites of skin healing: in vivo experimental study. Lasers Med Sci. 2025;40(1):153. Available from: https://doi.org/10.1007/s10103-025-04410-1. doi: 10.1007/s10103-025-04410-1

18. Alvarenga MOP, Bittencourt LO, Mendes PFS, Ribeiro JT, Lameira OA, Monteiro MC, et al. Safety and effectiveness of copaiba oleoresin (C. reticulata Ducke) on inflammation and tissue repair of oral wounds in rats. Int J Mol Sci. 2020;21(10):3568. Available from: https://doi.org/10.3390/ijms21103568. doi: 10.3390/ijms21103568

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

19. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. Biomed Res Int. 2019;2019:3708260. Available from: https://doi.org/10.1155/2019/3706315. doi: 10.1155/2019/3706315

20. Sampaio LAS, Costa JS, Freire TFC, Reis SRA, Deiró TCBJ, Medrado ARAP. Influence of protein malnutrition on cutaneous wound healing in rats. Rev Nutr. 2018;31(5):433-442. Available from: https://doi.org/10.1590/1678-98652018000500001. doi:10.1590/1678-98652018000500001

21. Fortuna T, Gonzalez AC, Sá MF, Andrade ZA, Reis SRA, Medrado ARAP. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. Int Wound J. 2018;15(2):274-282. Available from: https://doi.org/10.1111/iwj.12861. doi: 10.1111/iwj.12861

22. Hegouet IC, Lima SS, Medrado ARAP. Efeitos da ozonioterapia sobre as fibras colágenas e elásticas no reparo cutâneo: um estudo histomorfométrico em ratos. Rev Ciênc Méd Biol. 2024;23(2):242-248. Available from: https://doi.org/10.9771/cmbio.v23i2.64117. doi: 10.9771/cmbio.v23i2.64117

23. Pourhashemi E, Amini A, Ahmadi H, Ahrabi B, Mostafavinia A, Omidi H, et al. Photobiomodulation and conditioned medium of adipose-derived stem cells for enhancing wound healing in rats with diabetes: an investigation on the proliferation phase. Lasers Med Sci. 2024;39(1):46. Available from: https://doi.org/10.1007/s10103-024-03974-8. doi: 10.1007/s10103-024-03974-8

24. Mostafavinia A, Amini A, Sajadi E, Ahmadi H, Rezaei F, Ghoreishi SK, et al. Photobiomodulation therapy was more effective than photobiomodulation plus arginine on accelerating wound healing in an animal model of delayed healing wound. Lasers Med Sci. 2022;37(1):403-415. Available from: https://doi.org/10.1007/s10103-021-03271-8. doi: 10.1007/s10103-021-03271-8

25. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. J Korean Med Sci. 2009;24(3):368-374. Available from: https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.3.368. doi: 10.3346/jkms.2009.24.3.368

26. Pchepiorka R, Moreira MS, Lascane NADS, Catalani LH, Allegrini S Jr, de Lima NB, et al. Effect of ozone therapy on wound healing in the buccal mucosa of rats. Arch Oral Biol. 2020;119:104889. Available from: https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104889. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104889

27. Cardoso JM, Ervolino E, Miyasawa EM, Theodoro LH, Padovan LEM, Pereira EL, et al. Unveiling the therapeutic potential of systemic ozone on skin wound repair: clinical, histological, and immunohistochemical study in rats. Biomed Res Int. 2024;2024:6623114. Available from: https://doi.org/10.1155/2024/6623114. doi: 10.1155/2024/6623114

28. Soares CD, Morais TML, Araújo RMFG, Meyer PF, Oliveira EAF, Silva RMV, et al. Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats. Growth Factors. 2019;37(1-2):95-103. Available from: https://doi.org/10.1080/08977194.2019.1643339. doi: 10.1080/08977194.2019.1643339

29. Acikan I, Sayeste E, Bozoglan A, Artas G, Isayev A, Kirtay M, et al. Evaluation of the effects of topical application of chlorhexidine, ozone, and metronidazole on palatal wound healing: a histopathological study. J Craniofac Surg. 2022;33(6):1929-1933. Available from: https://doi.org/10.1097/scs.0000000000008390. doi: 10.1097/SCS.0000000000008390

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

30. Xiao W, Tang H, Wu M, Liao Y, Li K, Li L, et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Biosci Rep. 2017;37(6):BSR20170658. Available from: https://doi.org/10.1042/bsr20170658. doi: 10.1042/BSR20170658

31. Sathwik M, Komarraju S, Sathyanath D, Muralidharan S. Technical considerations of ozonated oils in medical applications: a narrative review. Cureus. 2025;17(4):e83185. Available from: https://doi.org/10.7759/cureus.83185. doi: 10.7759/cureus.83185

32. Rafiei Y, Ghamsari SM, Sasani F, Ezzaty A, Golchin D, Akbari AM, et al. Evaluation of the healing effects of different methods of using ozone in third-degree skin burns in the rat experimental model. Iran J Vet Surg. 2025;20(1):47-54. Available from: https://doi.org/10.30500/ivsa.2024.453505.1402. doi: 10.30500/ivsa.2024.453505.1402

33. Liu L, Zeng L, Gao L, Zeng J, Lu J. Ozone therapy for skin diseases: cellular and molecular mechanisms. Int Wound J. 2023;20(6):2376-2385. Available from: https://doi.org/10.1111/iwj.14060. doi: 10.1111/iwj.14060

34. Krkl C, Yiğit MV, Özercan İH, Aygen E, Gültürk B, Artaş G. The effect of ozonated olive oil on neovascularization in an experimental skin flap model. Adv Skin Wound Care. 2016;29(7):322-327. Available from: https://doi.org/10.1097/01.asw.0000484172.04260.46. doi: 10.1097/01.ASW.0000484172.04260.46

35. Zhu M, Cao L, Melino S, Candi E, Wang Y, Shao C, et al. Orchestration of mesenchymal stem/stromal cells and inflammation during wound healing. Stem Cells Transl Med. 2023;12(9):576-587. Available from: https://doi.org/10.1093/stcltm/szad043. doi: 10.1093/stcltm/szad043

36. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. Adv Drug Deliv Rev. 2019;146:97-125. Available from: https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.09.010. doi: 10.1016/j.addr.2018.09.010

37. Castro TNS, Martignago CCS, Assis L, de Alexandria FED, Rocha JCT, Parizotto NA, et al. Effects of photobiomodulation therapy in the integration of skin graft in rats. Lasers Med Sci. 2020;35(4):939-947. Available from: https://doi.org/10.1007/s10103-019-02909-y. doi: 10.1007/s10103-019-02909-y

38. de Oliveira LP, Chagas AL, de Souza TR, Araújo IR, de Menezes LB, Miguel MP, et al. Low-power laser in increasing doses improve wound healing process in rats. Lasers Med Sci. 2023;38(1):60. Available from: https://doi.org/10.1007/s10103-023-03716-2. doi: 10.1007/s10103-023-03716-2

39. Andrade TOS, Dantas BL, Cerqueira CBS, Badaró P, Marchionni AMT, Medrado ARAP. Comparative study of the effectiveness of ozone therapy and laser photobiomodulation upon experimental wound repair: systematic review. Res Soc Dev. 2022;11(5):e58911528650. Available from: https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28650. doi: 10.33448/rsd-v11i5.28650

40. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The bigger picture: why oral mucosa heals better than skin. Biomolecules. 2021;11(8):1165. Available from: https://doi.org/10.3390/biom11081165. doi: 10.3390/biom11081165

41. Moreira SH, Pazzini JM, Álvarez JLG, Cassino PC, Bustamante CC, Bernardes FJL, et al. Evaluation of angiogenesis, inflammation, and healing on irradiated skin graft with low-level laser

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

REVISTA CIENTÍFICA - RECIMA21 ISSN 2675-6218

therapy in rats (Rattus norvegicus albinus Wistar). Lasers Med Sci. 2020;35(5):1103-1109. Available from: https://doi.org/10.1007/s10103-019-02917-y. doi: 10.1007/s10103-019-02917-y

42. Calisto FC, Calisto SL, Souza AP, França CM, Ferreira AP, Moreira MB. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. Acta Cir Bras. 2015;30(3):204-208. Available from: https://doi.org/10.1590/s0102-865020150030000007. doi:10.1590/S0102-865020150030000007

43. Hidayat AT, Arifin MT, Nur M, Muniroh M, Susilaningsih N. Ozonated Aloevera oil effectively increased the number of fibroblasts and collagen thickening in the healing response of full-thickness skin defects. Int J Inflam. 2021;2021:6654343. Available from: https://doi.org/10.1155/2021/6654343. doi: 10.1155/2021/6654343

Este artigo é publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional (CC-BY), que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.