

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO OXIDATIVO COM
OXIGÊNIO/OZÔNIO TERAPIA NO CONTROLE DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA PELO BIOGEL E DO
CHOQUE ENDOTÓXICO POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS**

WHERICK ABREU BERNADI

VILA VELHA-ES

Dezembro/2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO OXIDATIVO COM
OXIGÊNIO/OZÔNIO TERAPIA NO CONTROLE DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA PELO BIOGEL E DO
CHOQUE ENDOTÓXICO POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS**

Dissertação apresentada a
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciência Animal para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

WHERICK ABREU BERNADI

VILA VELHA-ES

Dezembro/2014

Catalogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B523e Bernadi, Wherick Abreu.

Efeito do pré-condicionamento oxidativo com oxigênio/ozônio terapia no controle da resposta inflamatória aguda induzida pelo biogel e do choque endotóxico por lipopolissacarídeo em camundongos geneticamente selecionados / Wherick Bernadi Abreu. – 2014.

62 f.: il.

Orientador: Profª. Drª. Clarisse Simões Coelho.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Ozônio. 2. Rato como animal de laboratório. 3. Inflamação. 4. Processo inflamatório. I. Coelho, Clarisse Simões. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.0885

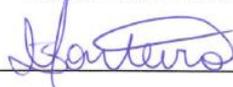
WHERICK ABREU BERNADI

**EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO OXIDATIVO COM
OXIGÊNIO/OZÔNIO TERAPIA NO CONTROLE DA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA PELO BIOGEL E DO
CHOQUE ENDOTÓXICO POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS**

Dissertação apresentada a
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciência Animal para
obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal

Aprovada em 10 de dezembro de 2014,

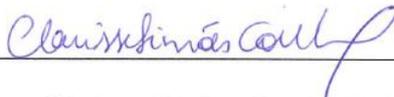
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Betânia Souza Monteiro (UVV)



Prof. Dra. Denise Coutinho Endringer (UVV)



Prof. Dra. Clarisse Simões Coelho (Orientadora-UVV)

Dedico este trabalho a meus pais Vicente e Beth, meus irmãos, minha namorada e minha avó Tita (*in memoriam*) que fizeram se tão importantes nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vinicius Ricardo Cuña de Souza e sua esposa, a Profa. Dra. Clarisse Simões Coelho, pela imensa paciência e orientação durante este trabalho. Apesar de todos os imprevistos que enfrentamos durante esse trabalho, sempre se mantiveram firmes no objetivo e tornaram-se grandes exemplos para me dar forças para que este trabalho fosse finalizado. Obrigado!

A Dra. Andrea Borrego pelo ajuda na execução dos experimentos durante o período em que estive no Instituto Butantan e a todos os pesquisadores do Instituto Butantan envolvidos nessa etapa (Wafa H. K. Cabrera, José Ricardo Jensen, Nancy Starobinas, Orlando Garcia Ribeiro Filho, Monica Spadafora Ferreira).

Aos alunos presentes no Laboratório de Imunogenética, Karen, Felipe, Fernanda, Flávia, Jéssica, Natália, Tamiris, Verena e aos colegas pós-graduandos pela amizade.

Aos funcionários do biotério do Laboratório de Imunogenética pelo cuidado e ajuda com os animais.

A meus amigos, que mesmo distantes, estiveram sempre comigo quando precisava.

A minha namorada pela paciência, carinho e por entender os momentos de ausência que precisei para terminar tal experimento.

Agradeço sinceramente a amizade e companheirismo do meu irmão Weriton por me acolher durante o período em que estive em São Paulo.

A meu irmão Whesley por não medir esforços para ir a São Paulo de carro para buscar todo o material.

A meus pais e familiares pelo apoio devido à distância.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Divergência fenotípica da reação inflamatória aguda mediada pela migração celular e extravasamento protéico nas diferentes gerações de acasalamento seletivo bidirecional das linhagens AIRmax e AIRmin	4
Figura 2	Modelo de gerador de ozônio patenteado por Nickola Tesla no dia 22 de setembro de 1896	9
Figura 3	Algumas moléculas de oxigênio (5%) quando passam pela barreira dielétrica são dissociada e unem-se a moléculas de oxigênio que não foram dissociadas, formando o ozônio e resultando na mistura O ₂ /O ₃	10
Figura 4	Relação entre a concentração de ozônio e seu efeito no organismo celular	13
Figura 1a	Quantificação da expressão gênica para (A) <i>Il6</i> , (B) <i>Tnf</i> , (C) <i>Il1b</i> e (D) <i>Il10</i> em células do fígado de animais AIRMax que receberam somente o estímulo de 20µg de LPS (grupo controle) e animais que receberam o tratamento com ozônio e posteriormente o estímulo de 20µg de LPS (grupo experimental. 8 animais de cada grupo após receberem a dose de LPS foram sacrificados 40 min após o desafio, o mRNA foi extraído e transformado em cDNA, a expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR. Os grupos (controle e experimental) não apresentaram diferenças significativas (p<0,05)	24
Figura 2a	Quantificação da expressão gênica para (A) <i>Il6</i> , (B) <i>Tnf</i> , (C) <i>Il1b</i> e (D) <i>Il10</i> em células do fígado de animais AIRMax ^{RR} e AIRMax ^{SS} que receberam somente o estímulo de 20µg de LPS (grupo controle) e animais que receberam o tratamento com ozônio e posteriormente o estímulo de 20µg de LPS (grupo experimental. 8 animais de cada grupo após receberem a dose de LPS foram sacrificados 40 min após o desafio, o mRNA foi extraído e transformado em cDNA, a expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR. Os grupos (controle e experimental) não apresentaram diferenças significativas (p<0,05)	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência de <i>primers</i> utilizados na síntese de mRNA	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
°C	Graus Celcius
µg	Microgramas
2,3-DGP	2,3-difosfoglicerato
AHT-M	Autohemoterapia maior
AHT-m	Autohemoterapia menor
AIR	Resposta inflamatória aguda (<i>Acute inflammatory reaction</i>)
AIRmax	Linhagem de camundongos selecionados para a máxima resposta inflamatória
AIRmin	Linhagem de camundongos selecionados para a mínima resposta inflamatória
ATP	Trifosfato de adenosina
CID	Coagulação intravascular disseminada
C_T	Cycle threshold
DBD	Descarga barreira dielétrica
DL₅₀	Dose letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucléico
F0	População inicial, fundadora
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona peroxidase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
i.p	Intraperitoneal

i.v	Intravenoso
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
kDa	Quilodálon
km	Quilômetros
LBP	Proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LOP	Produto da oxidação lipídica
LPS	Lipopolissacarídeo
MDB	Membrane desalting buffer
mL	Mililitros
mM	Micromolar
NaCl	Cloreto de sódio
NO⁻	Óxido nítrico
O₂⁻	Ânion superóxido
O₂	Oxigênio
O₂Hb	Oxihemoglobina
O₃	Ozônio
OH⁻	Radical hidroxila
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PBS	Soro fetal bovino
Poll	Mistura homogênea
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
RNA	Ácido ribonucléico

ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c	Subcutâneo
<i>Slc11a1</i>	<i>Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1</i>
SOD	Superóxido dismutase
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
UV	Ultravioleta

RESUMO

BERNADI, Wherick Abreu, M.Sc., Universidade Vila Velha–ES, dezembro de 2014. **Efeito do pré-condicionamento oxidativo com oxigênio/ozônio terapia no controle da resposta inflamatória aguda induzida pelo Biogel e do choque endotóxico por lipopolissacarídeo em camundongos geneticamente selecionados.** Orientadora: Clarisse Simões Coelho. Co-orientadora: Andrea Borrego.

O pré-condicionamento oxidativo com a oxigênio/ozônio terapia é uma forma de equilibrar o balanço redox celular e o sistema antioxidante previamente à exposição a um dano celular. As linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin foram obtidos por seleção gênica bidirecional respondendo para máxima e mínima resposta inflamatória aguda quando estimulados subcutaneamente com o Biogel. Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do ozônio frente à reação inflamatória aguda produzida pelo Biogel e ao choque endotóxico induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *S. typhimurium* em animais da linhagem AIRmax e sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, homozigotas para os alelos do gene *Slc11a1*. Observou-se que a concentração utilizada da mistura oxigênio/ozônio, assim como a sua via de aplicação não foram eficientes em reduzir a celularidade local bem como modular os níveis das citocinas analisadas, quando comparados aos grupos controle. Esse estudo indica que as condições utilizadas no pré-condicionamento oxidativo com a mistura oxigênio/ozônio não foram eficazes nos animais selecionados para a alta resposta inflamatória aguda.

Palavras-chave: ozonioterapia, camundongos geneticamente selecionados, choque endotóxico, LPS, Biogel.

ABSTRACT

BERNADI, Wherick Abreu, M.Sc., Universidade Vila Velha–ES, december 2014. **Effect of oxidative preconditioning with oxygen / ozone therapy in the management of acute inflammatory response induced by Biogel and endotoxin shock by lipopolysaccharide in mice genetically selected.** Supervisor: Clarisse Simões Coelho. Co-supervisor: Andrea Borrego.

Oxidative preconditioning with oxygen/ozone therapy is a way to balance the cellular redox balance and the antioxidant system prior to exposure to a cell damage. The lines of AIRmax and AIRmin mice were obtained by bidirectional gene selection responding to high and low acute inflammatory response when stimulated subcutaneously with Biogel. This work aimed to study the effects of ozone across the acute inflammatory reaction of Biogel and endotoxin shock induced by lipopolysaccharide (LPS) of *S. typhimurium* in animals AIRmax lineage and sublineages AIRmaxRR and AIRmaxSS, homozygous for the alleles of the gene *Slc11a1*. It was observed that the concentration used of the mixture oxygen / ozone, as well as their application route was not effective in reducing local cellularity and modulate the levels of the cytokines studied compared to the control groups. This study indicates that the conditions used in the oxidative preconditioning with the mixture oxygen / ozone were not effective in animals selected for high acute inflammatory response.

Keywords: ozone therapy, mice genetically selected endotoxin shock, LPS, Biogel.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS		vii
LISTA DE TABELAS		viii
LISTA DE ABREVIATURAS		iv
RESUMO		xii
ABSTRACT		xiii
1.	Introdução	1
2.	Revisão de literatura	3
2.1	Animais geneticamente selecionados: Biogel e Estudo da Resposta Inflamatória Aguda.....	3
2.2	Lipopolissacarídeo (LPS).....	5
2.3	Citocinas no Início da Resposta Inflamatória.....	7
2.4	Oxigênio/ozônio terapia.....	7
2.4.1	Ozônio para fins medicinais.....	9
2.4.2	Mecanismo de ação do ozônio.....	13
3.	Objetivos	16
4.	Trabalho Científico	17
4.1	Artigo 1. Efeito do Pré-Condicionamento Oxidativo com Oxigênio/Ozônio Terapia no Controle do Choque Endotóxico por Lipopolissacarídeo em Camundongos Geneticamente Selecionados	17
4.2	Artigo 2. Efeito do Pré-Condicionamento Oxidativo com Oxigênio/Ozônio Terapia no Controle da Resposta Inflamatória Aguda Induzida pelo Biogel em Camundongos Geneticamente Selecionados.....	28
5.	Referências	41

1. INTRODUÇÃO

A primeira linha de defesa do organismo é a resposta inflamatória. Esta se faz importante quando desenvolvida de forma adequada com o intuito de restabelecer a integridade estrutural do organismo. Quando esta se desenvolve de forma inadequada, pode ser prejudicial (PERRETI, 1997; MEDZHITOV, 2008). Dor, calor, rubor, edema e até mesmo perda da função são sinais clássicos da inflamação (RYAN, MAJNO, 1977; NATHAN, 2002; SERHAN, 2004). Este processo pode ser induzido de forma similar por estímulos estéreis ou não infecciosos, como produtos químicos, toxinas, isquemia e reperfusão, trauma ou corpos estranhos (CHEN e NUÑEZ, 2010; ROCK *et al.*, 2010). Geralmente a inflamação é decorrente de um processo infeccioso que pode ser desencadeado por vírus, bactérias ou fungos. De forma experimental e em modelo animal, o processo inflamatório pode ser feito com o Biogel (IBAÑEZ *et al.*, 1992), com o propósito de estudar os eventos que ocorrem.

O Biogel é um polímero sintético estável composto de microesferas de poliacrilamida, não imunogênico, quimicamente inerte e não biodegradável capaz de gerar uma resposta inflamatória aguda quando aplicado no subcutâneo (SC) de camundongos. Após 24 horas da aplicação, esse agente é retirado e é feita uma avaliação considerando o número e a morfologia das células infiltradas (STIFFEL *et al.*, 1990).

Esse polímero é capaz de gerar uma inflamação estéril caracterizada principalmente pela infiltração de neutrófilos, macrófagos e produção de citocinas como IL-1beta (Interleucina 1Beta), IL-6 (Interleucina 6) e TNF-alfa (Fator de Necrose Tumoral Alfa) (CHEN, NUÑEZ, 2010).

O lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina está presente na membrana celular de bactérias gram-negativas e é liberado ao meio ambiente não somente quando estas morrem, mas também durante seu crescimento e divisão (PETSCH e ANPACH, 2000). Na sua estrutura contém o lipídeo A, a parte mais conservada da endotoxina que leva à estimulação de células do sistema imune (WYCKOFF *et al.*, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 2007).

As principais células envolvidas no reconhecimento de patógenos são neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (ADEREM, 2003; KAWAI, AKIRA, 2005). Uma das primeiras proteínas de reconhecimento do LPS é a proteína

ligadora de lipopolissacarídeo (LBP) que é considerada uma proteína de fase aguda presente no soro (DENTENER *et al.*, 2000). Quando o LBP liga-se com alta afinidade ao lipídeo “A” presente na endotoxina ocorre a sua apresentação aos receptores celulares. Com isso o LBP catalisa a transferência de LPS ao receptor CD14 ativando mais monócitos e células polimorfonucleares com a finalidade reconhecer e destruir o patógeno em questão (VAN AMERSFOORT *et al.*, 2003; ZWEIGNER *et al.*, 2006).

Os macrófagos ativados pelo LPS produzem grandes quantidades de radicais livres de oxigênio (conhecidas como EROs – Espécies Reativas de Oxigênio) e secretam mediadores inflamatórios como o TNF-alfa (BEUTLER *et al.*, 1985). Ao mesmo tempo, as células parênquimais do fígado são estimuladas pelo TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 a produzirem proteínas de fase aguda (HIEMSTRA *et al.*, 1993; VAN AMERSFOORT *et al.*, 2003).

O ozônio (O₃) é uma molécula tri-atômica de oxigênio (O₂). Forma-se quando as moléculas de oxigênio se rompem devido à radiação ultravioleta ou descarga elétrica e, os átomos separados combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio. É um gás com cheiro característico, de cor azulada, extremamente estável, além de muito reativo (BOCCI, 2011).

O ozônio medicinal é sintetizado por geradores específicos a partir do oxigênio puro em concentrações de no máximo 5% de ozônio em 95 % de oxigênio. Este gás pode ser utilizado com o intuito de reduzir a reação inflamatória, principalmente, modulando a mesma para que não seja mínima ou exagerada e regulando algumas citocinas pró e/ou anti-inflamatórias (MAIO, URRUCHI, 2007). Apesar dessa sua ação já comprovada por alguns autores, ainda faltam estudos que comprovem sua eficácia no controle da reação inflamatória.

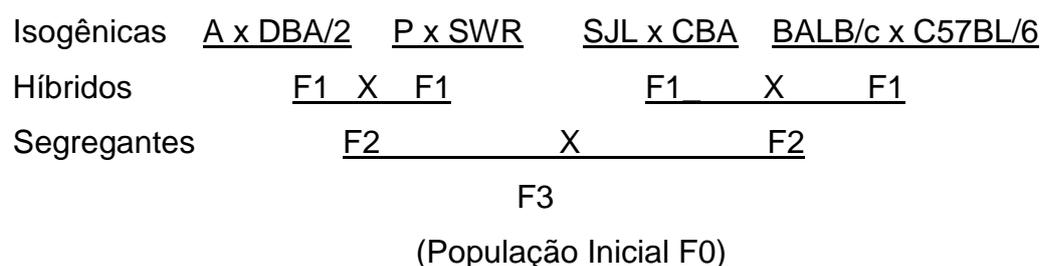
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Animais geneticamente selecionados: Biogel e estudo da resposta inflamatória

O controle multigênico de resistência às infecções vem sendo estudado em linhagens de camundongos heterogêneas geneticamente selecionadas para os extremos de suas potencialidades de resposta à produção de anticorpos ou inflamatória aguda (STIFFEL *et al.*, 1990; IBANÉZ *et al.*, 1992).

O Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan (São Paulo – Brasil) produziu, por seleção genética bidirecional, linhagens de camundongos que diferem quanto a capacidade de produção de anticorpos contra antígenos complexos (SANT'ANNA *et al.*, 1994) e na intensidade de reação inflamatória aguda (AIR – Acute Inflammatory Reaction) a microesferas de poliacrilamida (BIOGEL P₁₀₀; BIORAD, Tougar e Matingnom, França), substância insolúvel, não biodegradável e não imunogênica, cuja porosidade tem limite de exclusão protéica para moléculas acima de 100 kDa (IBANÉZ *et al.*, 1992).

O processo de seleção das linhagens de máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda teve início a partir de uma população heterogênea de camundongos (F0), resultante do acasalamento equilibrado de oito linhagens isogênicas de camundongos de origens independentes, cujo esquema está representado abaixo:



Como resultado obteve-se uma população com alta heterogeneidade gênica, em que cada indivíduo continha a combinação de 12,5% do *pool* gênico de cada uma das oito isogênicas parentais. Deu-se continuidade a seleção, escolhendo os animais para máxima e mínima resposta inflamatória através de mais de 20 gerações. Neste limite de seleção, considera-se que os alelos que apresentam efeitos opostos na resposta inflamatória, naqueles *loci* que eram

polimórficos na F0, estejam fixados em homozigose em cada linhagem. A análise do processo de seleção, empregando métodos de genética clássica, demonstrou a regulação poligênica da intensidade da AIR, com o envolvimento de 11 *loci* gênicos com efeito aditivo (BIOZZI *et al.*, 1998).

Ao longo da seleção gênica houve acentuação da diferença referente ao número de leucócitos migrantes no sítio inflamatório em resposta ao Biogel, sendo que os neutrófilos representam as principais células desse infiltrado, correspondendo a 85%, enquanto que os demais 15% são predominantemente de fagócitos mononucleares (RIBEIRO *et al.*, 2003). Essa diferença está correspondendo atualmente em torno de 20 vezes no número de células infiltradas e de 2,5 vezes na concentração protéica do exsudato, conforme **Figura 1**.

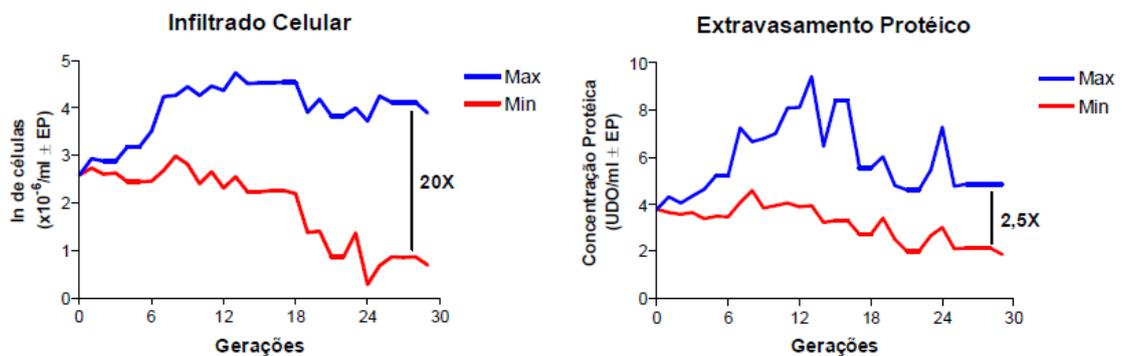


Figura 1. Divergência fenotípica da reação inflamatória aguda medida pela migração celular e extravasamento protéico nas diferentes gerações de acasalamento seletivo bidirecional das linhagens AIRmax e AIRmin.

Fonte: Modificado de BIOZZI *et al.* (1998), com permissão.

Este modelo animal tem demonstrado ser muito adequado para o estudo dos mecanismos de resposta inflamatória aguda e suas interações com a resposta imune específica em doenças autoimunes (VIGAR *et al.*, 2000; PETERS *et al.*, 2007; De Franco *et al.*, 2014), tumorais (BIOZZI *et al.*, 1998; MARIA., *et al.*, 2003; JENSEN *et al.*, 2013) e infecciosas (ARAUJO *et al.*, 1998; VORRARO *et al.*, 2014), além de apresentarem um perfil distinto de resposta na cicatrização e reparo tecidual (De FRANCO *et al.*, 2007; CANHAMERO *et al.*, 2011 e 2014).

Em estudos anteriores, animais da linhagem AIRmax mostraram-se extremamente resistentes à infecção por *Salmonella typhimurium* e *Listeria*

monocytogenes. É sabido que em camundongos a resistência à infecção por patógenos intracelulares depende da expressão de um gene denominado *Slc11a1* “Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1”.

Este gene está relacionado à regulação do ambiente intravacuolar do fagolisossomo alterando este ambiente e favorecendo ou não o crescimento bacteriano. Uma das teorias é que a proteína normal deste gene é capaz de transportar Fe^{2+} para o interior do fagolisossomo, favorecendo a formação de radical hidroxila que é altamente tóxico para a bactéria. Já a outra hipótese apoia que este gene é capaz de privar a disponibilidade de Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , que são fundamentais ao crescimento bacteriano, prejudicando assim a sua multiplicação no interior do fagolisossomo (WYLLIE *et al.*, 2002; FORTIER *et al.*, 2005; FRITSCHER *et al.*, 2008).

Devido a diferença de resistência entre os animais AIRmax e AIRmin para a infecção com *S. typhimurium* e o desequilíbrio de frequência dos alelos R e S do gene *Slc11a1* nestes animais, foram produzidas por acasalamentos seletivos por genotipagem sublinhagens homocigotas para estes alelos, denominadas AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} (BORREGO *et al.*, 2006; PETERS *et al.*, 2007). Alguns estudos demonstraram que os animais portadores em homocigose do alelo R do gene *Slc11a1* são muito resistentes à infecção por *S. typhimurium*. Os animais portadores do alelo S foram os mais suscetíveis à infecção. Este resultado é inversamente proporcional quando se fala da infecção por LPS: os animais portadores dos alelos R são suscetíveis enquanto os portadores do alelo S são resistentes (BORREGO *et al.*, 2006).

2.2 Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS ou endotoxina é uma molécula integrante da membrana celular de bactérias gram-negativas e é responsável por sua organização e estabilidade. Embora o LPS esteja firmemente ligado na parede celular bacteriana, ele é continuamente liberado ao ambiente. Esta liberação não ocorre somente quando a bactéria morre, mas também durante seu crescimento e divisão (PETSCH e ANSPACH, 2000). Quando isto ocorre, o LPS pode ser liberado através de complexos formados com proteínas da superfície bacteriana, ou como forma livre. O hospedeiro ao entrar em contato

com estas estruturas reage iniciando uma resposta inflamatória. Esta resposta é rapidamente iniciada por células do sistema imune inato e usualmente não requer a participação do sistema imune adaptativo.

É muito bem descrito que os processos inflamatórios são cruciais para a defesa do hospedeiro, ajudando-o, em muitas vezes, a eliminar a infecção. A resposta inflamatória é fortemente controlada, em muitas vezes, o processo leva à eliminação dos microrganismos sem a produção de sinais de inflamação clinicamente detectáveis. Entretanto, em condições severas, a resposta inflamatória contribui para o processo patológico que pode culminar em falência múltipla de órgãos, choque e até morte (HEUMANN, ROGER, 2002).

Varias células são hábeis em responder a endotoxina, entretanto as que pertencem ao sistema imune parecem ser as mais importantes. Cada tipo celular reage de uma maneira típica, através da produção de mediadores, fagocitose, proliferação e/ou diferenciação (ABBAS *et al.*, 2011).

A melhor população celular investigada que responde ao LPS são as células da linhagem monocítica-macrofágica. A função destas células durante a endotoxemia é demonstrada através de experimentos em que macrófagos sensíveis ao LPS são capazes de mediar o choque endotóxico diferentemente dos animais C3H/HeJ, resistentes ao LPS (FREUDENBERG *et al.*, 1996).

Uma vez estimulados pelo LPS, os monócitos / macrófagos produzem uma variedade de citocinas, incluindo as Interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1beta, IL-6 e IL-8) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa). Além destas citocinas, espécies reativas do oxigênio (EROs), principalmente, ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e óxido nítrico (NO^-) são produzidas. Metabólitos bioativos do ácido aracdônico (prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos) e do ácido linoleico (ácido S-13-hidroxinoleico), somados ao Fator de Ativação de Plaquetas (PAF) são produtos lipídicos de monócitos / macrófagos ativados (HOLST *et al.*, 1996).

Quando produzidos em pequenas quantidades iniciam no hospedeiro reações inflamatórias benéficas, como febre moderada, ativação de células de defesa, mecanismos microbicidas e inicio de reações de fase aguda. Entretanto, altas quantidades destes produtos desencadeiam efeitos nocivos no hospedeiro, induzindo varias efeitos patofisiológicos fatais, como febre alta, hipotensão arterial, coagulação vascular disseminada (CID) e injuria de células

e órgãos, o que pode resultar na manifestação da septicemia, falência múltipla de órgãos e choque séptico letal (RIETSCHEL *et al.*, 1994 e 1996).

2.3 Citocinas no Início da Resposta Inflamatória

No início da resposta inflamatória as citocinas IL-1beta, TNF-alfa e IL-6 têm sido alvo dos estudos para a aplicação clínica principalmente do tratamento de algumas doenças inflamatórias e autoimunes em que se demonstrou que ao bloqueando o prognóstico foi melhor (MOLLER, VILLIGER, 2006).

A IL-1beta é considerada uma citocina pró-inflamatória e sua produção depende do complexo inflamassoma. Sua principal função é regular a resposta da fase aguda ao dano tecidual, seja gerada por agentes infecciosos ou não infecciosos. Quando associado ao TNF-alfa, são considerados os maiores mediadores das respostas inflamatórias (WEBER *et al.*, 2010).

O TNF-alfa faz-se importante, pois é produzido por inúmeras células e é extremamente importante para a diferenciação, proliferação e sobrevivência das células do sistema imune. Também é considerado indutor da inflamação por estimular a síntese de outras citocinas responsáveis pela cascata inflamatória (PARAMESWARAN, PATIAL, 2010).

A interleucina IL-10 é responsável por inibir a produção de Th1, suprimir o fluxo de macrófagos e ativação de linfócitos B (ABBAS *et al.*, 2011).

Já a IL-6 é considerada uma citocina pleiotrópica, podendo ter ação pró ou anti-inflamatória. Sua produção pelos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais de tecidos inflamados é induzida principalmente pelo LPS, IL-1beta, TNF-alfa e alguns interferons. A IL-6 também funciona como agente quimiotático de monócitos (DESHMANE *et al.*, 2009).

2.4 Oxigênio-ozônio terapia

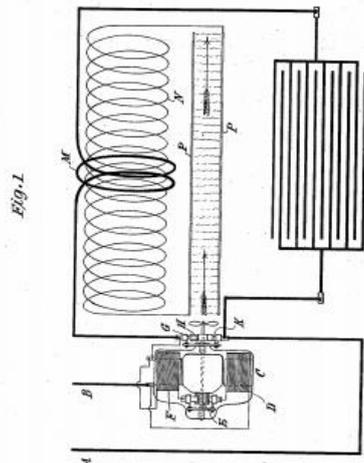
Em 1939, enquanto Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) fazia experimentos sobre eletrólise da água na Universidade de Basel (Suíça), começou a notar um odor característico em seu laboratório. Devido a este cheiro, Schönbein nomeou de “ozônio” esse novo gás, que vem a partir da

palavra grega "ozein", que significa "cheiro". O cheiro de ozônio (O_3) detectado é o mesmo que ocorre na proximidade de uma tempestade, um odor que indica a presença de ozônio na atmosfera (OESPER, 1929).

Após a descoberta do gás por Schönbein, observou-se que semelhante odor era detectado a nível atmosférico em períodos chuvosos, com alta incidência de descargas elétricas (raios). Após algumas pesquisas concluiu-se que este gás é produzido naturalmente e tem a capacidade de oxidar vários tipos de metais e que apresenta papel importante como agente desinfetante durante epidemias infecciosas (INPE, 2006).

Em 1857, Werner Von Siemens (1816-1892) desenvolveu o conceito de Descarga em Barreira Dielétrica (DBD) que consiste em um tubo oco recoberto por resistências elétricas que ao serem ativadas são capazes de gerar ozônio. Já em 1896, Nickola Tesla (1856-1943) desenvolveu o primeiro gerador de ozônio e patenteou nos Estados Unidos (MARDHARE *et al.*, 2009), como demonstrado na **Figura 2**.

(No Model.) N. TESLA. 2 Sheets—Sheet 1.
 APPARATUS FOR PRODUCING OZONE.
 No. 568,177. Patented Sept. 22, 1896.



Witnesses:

Raphael Netto
 Dury W. Cooper

Nikola Tesla, Inventor
 by Kerr, Curtis & Hoop. Att'ys.

Figura 2. Modelo de gerador de ozônio patenteado por Nickola Tesla no dia 22 de setembro de 1896.

Fonte: United States Patent and Trademark Office (2014).

O primeiro uso descrito dessa mistura foi na Alemanha no tratamento pós-cirúrgico de gangrena em soldados durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918). Já em 1936, na França, o Dr. P. Aubourg propôs o uso da insuflação retal com a mistura oxigênio/ozônio para tratamento de colites crônicas e fistulas. Dr. Erwin Payr foi o primeiro a usar uma seringa de vidro para injetar a mistura gasosa diretamente por via intravenosa, porém de forma lenta e com baixo volume de gás. Entretanto, algumas pessoas usaram dessa técnica para aplicar grandes volumes (acima de 500 mL em duas horas) e em muitos dos casos houve embolismo pulmonar e até mesmo morte. Devido a isto, em 1984, essa prática foi proibida em alguns países (BOCCI, 2005).

Este gás está presente na estratosfera, uma camada de aproximadamente 15 Km de extensão responsável por absorver a radiação ultravioleta (UV) produzida pelo sol e reduzir os raios UV que chegam à superfície terrestre (SIVASAKTHIVEL, REDDY, 2011). Este mesmo gás também é liberado por motores a combustão, sendo assim responsável juntamente com outros gases por problemas respiratórios, principalmente em regiões metropolitanas (CALABRESE e BALDWIN, 1998; JERRET *et al.*, 2009; BELL *et al.*, 2000; CALABRESE, 2010).

De acordo com o INPE (2006), em boa parte da atmosfera, principalmente em grandes centros urbanos, onde há grandes “domus” (bolha) de poluição, há a formação do ozônio por reações fotoquímicas. A este gás em associação com outros, são relatados doenças respiratórias em determinadas épocas do ano.

2.4.1 Ozônio para fins medicinais

O ozônio (O_3) quando utilizado para fins medicinais deve ser preparado a partir de uma fonte de oxigênio medicinal (O_2 ; com 99,6% de pureza), ao contrário do ozônio para desinfecção de ambiente que pode ser preparado a partir do ar ambiente. Quando preparado a partir de fonte de gás não estéril, são gerados, além do ozônio, outros gases poluentes responsáveis por problemas respiratórios (BOCCI, 2006).

O ozônio medicinal é uma mistura gasosa que contém 95% de oxigênio e somente 5% de ozônio, por isso chamada de oxigênio/ozônio terapia. Apesar

de serem apenas 5% de ozônio, estes são mais que suficientes para gerar seu efeito oxidativo. Essa mistura é produzida por meio de um gerador de ozônio medicinal conectado a um cilindro de oxigênio medicinal puro. Este aparelho é capaz de gerar uma descarga elétrica (barreira dielétrica) e aplicá-la no oxigênio (que contém 2 átomos de oxigênio), dissociando-o e fazendo surgir o ozônio (**Figura 3**), uma molécula de oxigênio unida a 1 átomo do mesmo gás (BOCCI, 2004; CANDIDO, 2001; KUNZ *et al.*, 1999).

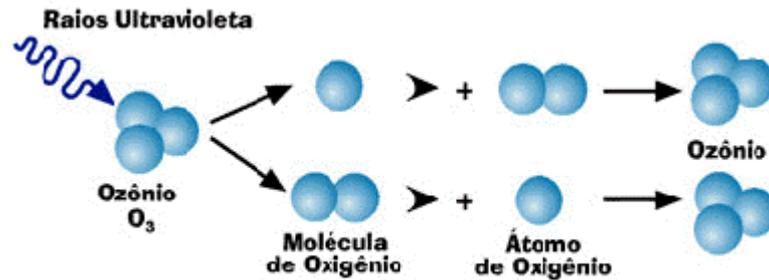


Figura 3. Algumas moléculas de oxigênio (5%) quando passam pela barreira dielétrica são dissociadas e unem-se a moléculas de oxigênio que não foram dissociadas, formando o ozônio e resultando na mistura O_2/O_3 .

Fonte: www.o3r.com.br.

Essa mistura gasosa é constantemente produzida enquanto o aparelho está em funcionamento. Ao ser utilizado para o uso medicinal, essa mistura é captada através de uma torneira de três vias em seringa composta de material ozônio resistente (por exemplo, vidro, teflon, silicone e livre de látex). Faz-se importante o uso de seringa ozônio resistente (principalmente as livres de látex), pois o ozônio é capaz de degradar o material e levar para o paciente micro partículas responsáveis por efeitos indesejados (VIEBAHN-HANSLER, 2002; BOCCI, 2004). O gerador de ozônio contém um filtro destruidor de ozônio acoplado (geralmente feito de carvão ativado), responsável por liberar o gás no ambiente em forma de oxigênio.

Atualmente, esta terapia é reconhecida pelo sistema de saúde de alguns países, como Alemanha, Suíça, Itália, Cuba, Ucrânia, Rússia, Espanha, Grécia, Egito e da Austrália, além de ser praticada em 15 estados dos Estados Unidos. Nestes países houve redução de 27% no consumo total de antibióticos e de 22% no consumo de analgésicos opióides e não opióides, além dos efeitos colaterais causados por ambos, principalmente quando administrados por

longo prazo (GOÑI-URRIZA *et al.*, 2000; MACAULEY *et al.*, 2006; SHIU, 2007; RIJAL *et al.*, 2009). Apesar de extremamente oxidante por um lado e tóxico para as vias respiratórias, este gás faz-se importante devido seus efeitos benéficos à saúde (BOCCI, 2011).

As complicações com relação a essa terapia não são frequentes, correspondendo a somente 0,0007%. Os efeitos adversos mais comuns são lacrimejamento, irritação das vias aéreas superiores, rinite, tosse, dor de cabeça e, ocasionalmente, náusea e vômito (BOCCI, 2002; NOGALES *et al.*, 2008). De acordo com Viebahn-Hansler (2002), em casos de intoxicação recomenda-se manter o paciente deitado, oferecer inalação de oxigênio umidificado, administrar ácido ascórbico, vitamina E e acetilcisteína.

De acordo com os estudos sobre o ozônio da Associação Brasileira de Ozonioterapia, o ozônio medicinal tem propriedades altamente bactericidas, fungicidas e antivirais (ABOZ, 2014). Outros trabalhos realizados demonstram que o ozônio auxilia como protetor de infarto do miocárdio uma vez que age incrementando a capacidade das hemácias no transporte de oxigênio (DI FILIPPO *et al.*, 2010) e outros problemas vasculares (BOCCI, 2011). Sua ação antisséptica (bactericida) foi descrita quando associado à água deionizada para tratamento de lesões periodontais de origem infecciosa (NAGAYOSHI *et al.*, 2004). Também foi descrito sua ação em lesões herpéticas (MACEDO, CARDOSO, 2005) e seu uso na prevenção e tratamento da mastite bovina em produções leiteiras (PEREIRA, GARCIA, 2006). O uso do óleo de sementes de girassol ozonizado já foi descrito no reparo tecidual após injúria traumática com resultados satisfatórios, pois aumenta os níveis de peróxido do óleo, agregando a ele maior capacidade de cicatrização (RODRIGUES *et al.*, 2004). Em equinos, aumenta a capacidade de oxigenação sanguínea em lesão de reperfusão em jejuno (ALVES, 2004); e até mesmo seu uso para tratamento de infecção abdominal em ratos (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Outros estudos demonstram que além de aprimorar o sistema circulatório, produzindo aumento na oxigenação tecidual, essa mistura gasosa é responsável por estimular a produção de antioxidantes endógenos e causar, assim, um efeito imunomodulador (por exemplo, através da estimulação da liberação de citocinas) uma vez que reage instantaneamente com os ácidos

graxos poliinsaturados da superfície da membrana celular e é rapidamente absorvido (WOLFF, 1996; BOCCI, 2011; JUNIOR, 2012).

Essa mistura gasosa pode ser aplicada por diversas vias, podendo estas serem divididas em parenteral ou local. Dentre as parenterais podem-se citar a autohemoterapia maior (AHT-M), que consiste na retirada de até 8% do volume de sangue baseado no peso vivo do animal numa bolsa de coleta de sangue, ozonizar a bolsa sanguínea e retorna com o sangue ozonizado por via endovenosa; a autohemoterapia menor (AHT-m), que é a retirada de 5 a 10 mL de sangue em seringa previamente ozonizada e aplicar por via intramuscular. Algumas outras vias consistem na aplicação direta da mistura gasosa por via intramuscular, intradiscal (no disco intervertebral em casos de protusão ou extrusão do disco), intra-articular, subcutânea e intraperitoneal (também conhecida como pneumoperitônio). Já dentre as vias de aplicação locais tem-se a administração por via retal, que é feita com o auxílio de uma sonda adequada ao tamanho e espécie trabalhada, inserida por via retal previamente limpa para que o gás não reaja com as fezes presentes no reto; bolsa (“bagging”) e solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) ou óleo ozonizado (RODRIGUES *et al.*, 2004; BOCCI, 2006).

A concentração do ozônio é regulada no aparelho e cada uma é responsável por uma ação, como demonstrado na **Figura 4**. Na concentração de 2 µg/mL anticelulite, 5 µg/mL antirruga, 10 µg/mL lipolítico, 15 µg/mL antiglogístico, 20 µg/mL analgésico, 25 µg/mL anti-inflamatório, 30 µg/mL imunoestimulante, 33 µg/mL antiacne, 40 µg/mL bactericida, 50 µg/mL virucida, 60 µg/mL fungicida, 70 µg/mL imunossupressivo e a 90 µg/mL esclerosante (BOCCI, 2011).

Na medicina veterinária, essa nova terapia vem sendo utilizada em enfermidades virais, respiratórias, bacterianas, fúngicas, enfermidades cancerosas, oftálmicas, dermatológicas, ortopédicas, nas discopatias, entre outras (MAIO e URRUCHI, 2007).

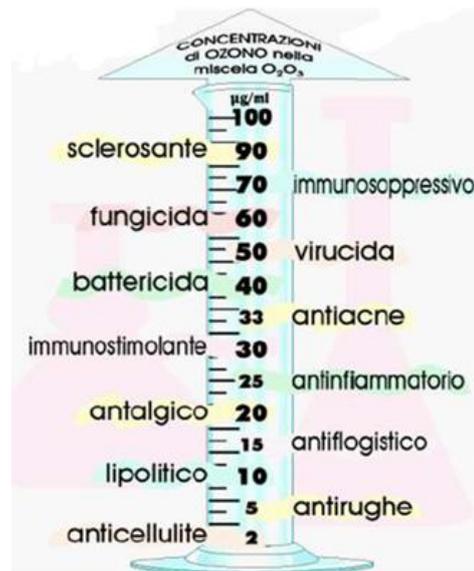


Figura 4. Relação entre a concentração de ozônio e seu efeito no organismo celular. FONTE: MARIA EMILIA GADELHA SERRA (2013; comunicação pessoal).

2.4.2 Mecanismo de ação do ozônio

O mecanismo de ação do ozônio pode ser distribuído em duas formas. A primeira refere-se quando o ozônio é aplicado por via tópica e exerce sua ação antimicrobiana e cicatrizante, acelerando a reparação tecidual. Já a outra forma refere a quando o ozônio é administrado ao paciente por via sistêmica. Este leva à ativação do metabolismo de hemácias e leva ao aumento de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DGP), que realiza a quebra o oxihemoglobina (O_2Hb), liberando assim maior quantidade de oxigênio para os tecidos. Desse oxigênio disponibilizado em maior quantidade ao tecido, 95-98% são convertidos em ATP que não é dependente de glicose e o restante (2-5%) é convertido em radicais livres responsáveis por causar estresse oxidativo agudo.

Sabe-se que a mistura oxigênio/ozônio, ao reagir com o plasma, ativa as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), p.ex., o superóxido (O_2^-), que aumentam imediatamente o metabolismo celular, sendo responsáveis por ativar moderadamente as células mononucleares do sistema imune promovendo a liberação de algumas citocinas como IL-1beta, IL-2, IFN- γ , TNF-alfa e TGF-beta) (BOCCI, 2011), agindo assim como mensageiros de meia vida muito curta. Entretanto, os EROs são responsáveis por promover danos no DNA, RNA e proteínas, liberando o átomo de ferro (Fe) do interior das enzimas

(desidratases), causando danos às suas estruturas. Uma das formas do organismo se proteger da ação deletéria do superóxido é através da enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (BOCCI, 2011).

Numa fase tardia, são produzidos os Produtos de Oxidação Lipídica (LOPs) que se distribuem para os tecidos e somente algumas moléculas se ligam a receptores celulares. Apresenta farmacodinâmica que permite minimizar suas toxicidades potenciais e permite torna-los mensageiros tardios. Bocci (2011) e Clavo *et al.* (2012) relatam que estes mensageiros, mesmo que em níveis submicromolares podem ser estimulatórios ao organismo e benéficos.

Ao ser absorvido, a mistura de gases leva a redução de algumas citocinas pró-inflamatórias, aumento das enzimas SOD e Glutathione Peroxidase (GPx), atuando assim como modulador da resposta inflamatória. A GPx é uma enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, fazendo parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular e defesa endógena neutralizante de radicais livres (DE SOUZA *et al.*, 2010).

De acordo com Bocci (2002), o ozônio reage preferencialmente com os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs); em seguida, com as moléculas com ação antioxidante como ácido ascórbico e o ácido úrico; compostos-SH como a cisteína e a glutathione reduzida (GSH); e por fim, com a albumina.

Devido a alta reatividade do ozônio com as duplas ligações de carbono (PUFAs) dos compostos orgânicos presentes em fluidos biológicos, ocorre a formação dos “ozonidos”, subprodutos responsáveis pelas ações celulares descritas (BOCCI, 2006).

Devido ao fato do ozônio gerar LOPs numa fase tardia, a dose deve ser regulada para ser responsável por causar um estresse oxidativo agudo, absolutamente transitório, que seja capaz de iniciar efeitos biológicos sem toxicidade (BOCCI, 2011; CLAVO *et al.*, 2012).

Outro produto gerado na reação do ozônio com os fluidos biológicos é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é considerada EROs fundamental. A água oxigenada é considerada um oxidante não radical capaz de reagir como um mensageiro do ozônio. Essa molécula também é capaz de atuar em células

sanguíneas mononucleares, em plaquetas, células endoteliais e no eritrócito (BOCCI, 2011).

Zamora *et al.* (2005) avaliaram os efeitos do pré-condicionamento oxidativo com oxigênio/ozônio terapia aplicada cinco dias previamente à indução do choque endotóxico com LPS de *Escherichia coli* em camundongos. Estes observaram redução significativa nos níveis séricos de TNF-alfa quando comparados com o grupo que não recebeu tratamento algum.

Já outros trabalhos que demonstram o efeito do ozônio aplicado por via tópica demonstram seu efeito bactericida até mesmo em baixas doses e por período curto de tempo. Fontes *et al.* (2012) avaliaram ação do ozônio na concentração de 20 µg de O₃/mL, em comparação com o oxigênio puro e um grupo controle sem gás algum. Por meio de uma placa de Petri adaptada com uma via de entrada e outra de saída de gás na tampa, a cultura bacteriana foi estabelecida e após um período de 24 e 48 horas após a perfusão de gás por 5 minutos em fluxo constante, foi realizada contagem bacteriana. Os autores observaram que no grupo do ozônio, houve inibição do crescimento bacteriano, enquanto que nos outros grupos houve crescimento exponencial. Para tal trabalho foram utilizadas bactérias multirresistentes, sendo que algumas foram isoladas de pacientes de cultivo laboratorial. Vale ressaltar que neste trabalho o ozônio foi eficaz também contra a KPC (*Klebsiella pneumoniae*).

Outro trabalho que demonstra o efeito tópico do ozônio foi o de Pereira *et al.* (2006) que compararam dióxido de carbono, hélio, ozônio e ar comprimido por uma hora em fluxo constante expostos a placas contendo cultura de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os autores observaram que o ozônio foi capaz de promover esterilização de 100% das bactérias, enquanto que os outros gases não alteraram significativamente nenhuma das culturas.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do pré-condicionamento oxidativo com oxigênio/ozônio terapia no controle da resposta inflamatória aguda induzida pelo Biogel e do choque endotóxico por lipopolissacarídeo em camundongos geneticamente selecionados, das linhagens AIRmax e AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}.

Objetivos específicos:

- 1- Em animais das linhagens AIRmax e AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} que foram submetidos ao pré-condicionamento oxidativo com oxigênio/ozônio terapia: Análise da expressão gênica, por meio do RNA mensageiro, de citocinas pró e antiinflamatórias, em células de fígado, após estímulo com LPS;
- 2- Comparação da contagem celular do exsudato inflamatório após indução do processo inflamatório com o Biogel

4. TRABALHO CIENTÍFICO

4.1 Artigo 1

O artigo científico foi confeccionado seguindo as instruções aos autores estabelecidas pela Revista Ozone: Science & Engineering, obtido no site <http://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?journalCode=bose20&page=instructions#.U9vKn IdWSo>

Efeito do Pré-Condicionamento Oxidativo com Oxigênio/Ozônio Terapia no Controle da Resposta Inflamatória Aguda Induzida pelo Biogel em Camundongos Geneticamente Selecionados

Wherick A. Bernadi¹, Andrea Borrego², Vinicius R. C. de Souza³, Clarisse S. Coelho^{4*}

Resumo

O pré-condicionamento oxidativo com a oxigênio/ozônio terapia é uma forma de equilibrar o balanço redox celular e o sistema antioxidante previamente à exposição a um dano celular. Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da oxigênio/ozônio terapia frente à reação inflamatória aguda produzida pelo Biogel em animais da linhagem AIRmax (n=16), homozigotas para os alelos do gene *Slc11a1*. Dois grupos foram formados e em um deles realizou-se o pré-condicionamento oxidativo com ozônio na dose de 1,2mg/Kg por 5 dias com aplicação intraperitoneal. No outro grupo foi realizado somente a indução do processo inflamatório agudo com 0,75 mL de Biogel P-100 e 24 horas após feito a contagem celular em Câmara de Malassez. Processo semelhante foi realizado no grupo controle após o pré-condicionamento. Observou-se que o G-RIA-C apresentou média celular de $6,48 \pm 0,31$ ($\times 10^5$ /mL) e o G-RIA-T de $6,43 \pm 0,09$ ($\times 10^5$ /mL). Foi possível concluir que a concentração utilizada da mistura oxigênio/ozônio, assim como a sua via de aplicação, não foram eficientes em reduzir a celularidade local no período analisado quando comparado ao grupo controle.

Palavras-chave: ozônio, camundongos, inflamação, Biogel.

Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

¹Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Vila Velha (UVV-ES)

²Profa. Dra. Laboratório Imunogenética Butantan, Instituto Butantan (IB-SP).

³Dr, Médico Veterinário. Quality Especialidades Veterinárias, Vitória- ES

⁴Profa. Dra. Programa de Pós Graduação da Universidade Vila Velha (UVV-ES). Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Vila Velha, ES, 29102-770.

* Autor para correspondência: clarisse.coelho@uvv.br

Introdução

O ozônio medicinal é uma mistura gasosa que contém 95% de oxigênio e somente 5% de ozônio, por isso chamada de oxigênio/ozônio terapia. Apesar de serem apenas 5% de ozônio, estes são mais que suficientes para gerar seu efeito oxidativo. Essa mistura é produzida por meio de um gerador de ozônio medicinal conectado a um cilindro de oxigênio medicinal puro. Este aparelho é capaz de gerar uma descarga elétrica (barreira dielétrica) e aplicá-la no oxigênio (que tem 2 átomos de oxigênio), dissociando-o e fazendo surgir o ozônio, uma molécula de oxigênio unida a 1 átomo do mesmo gás (KUNZ *et al.*, 1999; CANDIDO, 2001; BOCCI, 2004).

De acordo com os estudos sobre o ozônio da Associação Brasileira de Ozonioterapia, o ozônio medicinal tem propriedades altamente bactericidas, fungicidas e antivirais (ABOZ, 2014). Outros trabalhos realizados demonstram que o ozônio auxilia como protetor de infarto do miocárdio uma vez que age incrementando a capacidade das hemácias no transporte de oxigênio (DI FILIPPO *et al.*, 2010) e outros problemas vasculares (BOCCI, 2011). Sua ação antisséptica (bactericida) foi descrita quando associado à água deionizada para tratamento de lesões periodontais de origem infecciosa (NAGAYOSHI *et al.*, 2004). Também foi descrito sua ação em lesões herpéticas (MACEDO e CARDOSO, 2005) e seu uso na prevenção e tratamento da mastite bovina em produções leiteiras (PEREIRA e GARCIA, 2006). O uso do óleo de sementes de girassol ozonizado já foi descrito no reparo tecidual após injúria traumática com resultados satisfatórios, pois aumenta os níveis de peróxido do óleo, agregando a ele maior capacidade de cicatrização (RODRIGUES *et al.*, 2004). Em equinos, aumenta a capacidade de oxigenação sanguínea em lesão de reperfusão em jejuno (ALVES, 2004); e até mesmo seu uso para tratamento de infecção abdominal em ratos (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Os estudos da inflamação, e dos efeitos de terapias como a oxigênio/ozônio terapia sobre a mesma, são importantes e necessários. De forma experimental e em modelo animal, o processo inflamatório pode ser feito com o Biogel (IBÁÑEZ *et al.*, 1992), um polímero sintético estável composto de microesferas de poliacrilamida, não imunogênico, quimicamente inerte e não biodegradável, capaz de gerar uma resposta inflamatória aguda quando aplicado no subcutâneo (SC) de camundongos. Após 24 horas da aplicação,

esse agente é retirado e é feita uma avaliação considerando o número e a morfologia das células infiltradas (STIFFEL *et al.*, 1990). Esse polímero é capaz de gerar uma inflamação estéril caracterizada principalmente pela infiltração de neutrófilos, macrófagos e produção de citocinas como IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa (CHEN e NUÑEZ, 2010).

Visando contribuir com novas informações sobre a aplicação medicinal de ozônio, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do pré-condicionamento oxidativo com oxigênio/ozônio terapia no controle da resposta inflamatória aguda induzida pelo Biogel em camundongos geneticamente selecionados para a máxima resposta inflamatória, das linhagens AIRmax e AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}.

Materiais e Métodos

O presente projeto de pesquisa teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUA-IB), sendo registrado o protocolo de número 1243/14.

Camundongos das linhagens AIRmax (n=16, machos) criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan (IB), foram utilizados no experimento. Estes pesaram em média 25 gramas e apresentavam de 2-4 meses de idade.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com no máximo cinco camundongos/caixa, em ambiente com temperatura, luminosidade e umidade controladas, respeitando-se o ciclo circadiano de 12 horas. Alimentação e água foram mantidas “*ad libitum*” e diariamente os animais foram examinados. Qualquer alteração durante o tratamento foi registrada.

Os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos: G-RIA-C (controle – sem o pré-condicionamento oxidativo) e G-RIA.T (tratamento – submetidos ao pré-condicionamento oxidativo).

Pré-condicionamento oxidativo com a mistura de oxigênio/ozônio

O gerador de ozônio (OZONE&LIFE 3.0 RD) foi acoplado a um cilindro de oxigênio (oxigênio puro) e a quantidade desejada da mistura oxigênio/ozônio foi captada com auxílio de uma seringa livre de látex (TERUMO[®], Philippines). A concentração da mistura gasosa é determinada com regulação do aparelho gerador. A dose de ozônio utilizada foi de 1,2 mg/Kg de peso vivo aplicada em volume de 1 mL para cada animal do G-RIA-T, em 5 aplicações com intervalo de 24 horas entre as mesmas, seguindo protocolo sugerido por Zamora *et al* (2005). Essa mistura foi aplicada no quadrante abdominal inferior esquerdo (intraperitoneal, IP) com agulha de calibre fino (13 x 0,45 mm).

Resposta Inflamatória Aguda induzida pelo Biogel

No G-RIA-T (n=8, AIRmax), foi feita a tricotomia do dorso dos animais e 24 horas após a última aplicação da mistura gasosa, foi feita a aplicação no dorso de 0,75 mL do Biogel (P₁₀₀) (Biorad Laboratories, Inc, Hercules, CA,

Estados Unidos), previamente hidratado, seguindo protocolo descrito por Fauve *et al.* (1983). No dia seguinte (após 24 horas), o exsudato inflamatório foi colhido do dorso dos animais e feito a contagem celular em Câmara de Malassez por três analistas de forma independente.

No grupo controle (G-RIA-C; n=8, AIRmax) não foi feito o pré-condicionamento oxidativo com o mistura O_2/O_3 . Nestes animais foi somente realizado a tricotomia da região dorsal, aplicado no dorso 0,75 mL do Biogel e após 24 horas coletado e feito contagem celular em câmara de Malassez por três analistas de forma independente.

Análise estatística

Os dados da contagem celular em câmara de Malassez foram apresentados em médias e desvio padrão e a comparação entre as médias pelo teste t. Admitiu-se que os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 5.

Resultados

No acompanhamento diário dos animais não foram observadas quaisquer alterações clínicas, tais como apatia, febre ou dor.

Os resultados obtidos na contagem celular em câmara de Malassez foram divididos de acordo com o grupo. O G-RIA-C apresentou média celular de $6,48 \pm 0,31$ ($\times 10^5/\text{mL}$) e o G-RIA-T de $6,43 \pm 0,09$ ($\times 10^5/\text{mL}$), não havendo diferença significativa entre os grupos testados ($p > 0,05$). Para ambos os grupos não foi observado diferença na predominância do tipo celular presente, sendo 85% das células do exsudato formada por neutrófilos e os demais 15% predominantemente de fagócitos mononucleares.

Discussão

Para aplicação da mistura gasosa nos animais foram utilizadas seringas livre de látex porque, de acordo com Bocci (2011), o látex poderia entrar em contato com a mistura gasosa reagindo de forma inadequada.

A distensão abdominal causada pelo gás nos animais é momentânea, uma vez que a absorção dessa mistura gasosa pelo plasma sanguíneo se dá de forma rápida em aproximadamente 30 minutos (BOCCI, 2011). De acordo com estes mesmos autores que fizeram a administração intraperitoneal (De Souza *et al.*, 2010 e Di Filippo *et al.*, 2011), não se observou qualquer tipo de prostração do animal após a aplicação do gás ou desconforto durante a aplicação feita de forma lenta. Isso foi observado no presente pesquisa onde os animais do G-RIA-T não apresentaram desconforto abdominal. Este volume com a agulha especificada também é descrito como adequado pelo Manual do Comitê de Ética da FIOCRUZ (2013) como um volume adequado de aplicação em camundongos.

A aplicação intraperitoneal (quadrante lateral inferior direito) segue o modelo realizado nos trabalhos de Di Filippo *et al.* (2011) e De Souza *et al.* (2010) que avaliaram, respectivamente, os efeitos da aplicação da mistura oxigênio/ozônio por via intraperitoneal na redução de adesão peritoneal pós-cirúrgica e o efeito da mistura O₂/O₃ por via intraperitoneal no tratamento de infecção abdominal em ratos Wistar. Em ambos os trabalhos foi administrado a mistura O₂/O₃ com auxílio de uma agulha de baixo calibre (13x0,45mm; 26G ½) sem a utilização prévia de qualquer tipo de sedativo ou analgésico, uma vez que estes podem interferir nos resultados. Outros trabalhos foram realizados com a aplicação intraperitoneal da mistura O₂/O₃ sem o uso prévio de sedativos, anestesia ou qualquer tipo de controle da dor (SCHULZ *et al.*, 2008; BETTLE *et al.*, 2006), assim como no presente trabalho.

O trabalho de Schulz *et al.* (2008), realizado em coelhos, demonstrou os efeitos da mistura O₂/O₃ quando aplicado por via intraperitoneal levou a completa remissão de células tumorais de carcinoma de células escamosas. O grupo tratado com O₂/O₃ apresentou taxa de sobrevivência de 50% (7/14) enquanto o grupo que só recebeu oxigênio teve taxa de sobrevivência de 23% (3/13). Esperava-se na presente pesquisa uma resposta semelhante, com o ozônio atingindo a circulação sanguínea e gerando efeitos sobre a reação inflamatória aguda induzida pelo Biogel, entretanto isso não foi observado dentro do protocolo testado.

Diferentemente da presente pesquisa onde não foi observada diferença na expressão de TNF-alfa com o pré-condicionamento com a mistura de O₂/O₃,

Zamora *et al.* (2005) descreveram uma inibição sérica de TNF-alfa, porém estes induziram o choque endotóxico com LPS aplicado por via intraperitoneal. Gultekin *et al.* (2013) também descreveram que o pré-condicionamento oxidativo pode aumentar o mecanismo de defesa antioxidante em ratos protegendo os da radiação que induz toxicidade aos órgãos. Em seu protocolo, eles induziram o dano aos órgãos em ratos da linhagem Wistar por meio da radiação e aplicação pela via intraperitoneal 2,3 mL de O₂/O₃ na dose de 0,72mg/Kg, diariamente, por 5 dias consecutivos. Na presente pesquisa, a dosagem da mistura de oxigênio-ozônio foram superiores em comparação com os pesquisadores supracitados, mas o fato de ser maior não significou eficácia. Já é sabido que uma dose excessiva de ozônio pode, além de desregular os mecanismos antioxidantes, lesionar diretamente a célula. Da mesma forma uma dose baixa seria insuficiente para gerar o mecanismo imunológico.

Entretanto, segundo Zamora *et al.* (2005) a redução foi dose dependente (à medida que se aumenta a dose da mistura O₂/O₃ administrado há maior inibição sérica), visto que em seu experimento eles testaram o pré-condicionamento oxidativo em camundongos com doses diferentes. Um grupo recebeu a dose de 0,2 mg/Kg, outro recebeu de 0,4 mg/Kg e outro de 1,2 mg/Kg, cinco aplicações de cerca de 1mL por via intraperitoneal, com intervalo de 24 horas. Após 24 horas da última administração induziram o choque endotóxico com LPS de *Escherichia coli* por via intraperitoneal. Esse mesmo intervalo de aplicação da última mistura gasosa e o período de aplicação foi adotado na presente pesquisa. Essa padronização é essencial para a realização de estudos comparativos de diferentes doses da oxigênio/ozônio terapia em camundongos para confirmar tal processo em diferentes processos inflamatórios.

DI FILIPPO *et al.* (2011) induziram a formação experimental de adesões pós- cirúrgicas em ratos Wistar e iniciam o tratamento com 3 mL da mistura O₂/O₃ na dose de 300 µg/Kg e 3 mL de oxigênio puro no grupo controle 10 dias após a indução da adesão peritoneal. No grupo que recebeu somente o oxigênio observou-se que 7 dos 15 animais apresentavam o maior índice de adesões peritoneal, com impossibilidade de acessar o abdome. Já no grupo que recebeu a mistura O₂/O₃ houve uma redução significativa na quantidade de

adesões formadas, comprovando que a mistura gasosa foi aparentemente capaz de modular a resposta inflamatória, fato este que não pôde ser comprovado na presente pesquisa.

Em grande parte dos trabalhos (ZAMORA *et al.*, 2005; SCHULZ *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2010; DI FILIPPO *et al.*, 2011; GUTEKIN *et al.*, 2013) em que foi utilizada a mistura O₂/O₃ para tratamento de algum processo infeccioso ou não, através da aplicação intraperitoneal, foi que sempre o ozônio era apresentado de forma direta ao patógeno ou ao processo inflamatório, resultando assim em resultados favoráveis ao uso de tal tratamento tanto como ação pós-cirúrgica ou no pré-condicionamento oxidativo. Em todos os trabalhos analisados foram observados efeitos benéficos de tal terapia para controle da resposta inflamatória em animais isogênicos.

Esse foi o primeiro estudo realizado com o pré-condicionamento oxidativo de ozônio nos animais geneticamente selecionados para a resposta inflamatória aguda. E apesar de utilizar doses e períodos de administração já descritos na literatura para esse pré-condicionamento oxidativo, o mesmo não foi suficiente para reduzir o número de células do exsudato inflamatório após estímulo da AIR com Biogel.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a mistura oxigênio/ozônio aplicada pela via intraperitoneal, na dose e intervalo de administração utilizado, não foi eficaz em reduzir a resposta inflamatória aguda pelo Biogel.

Referências

ABOZ. Informações que a Sociedade Europeia de Ozonioterapia Recomenda Sejam dadas aos Pacientes, Brasil, 2014.

ALVES, G. E. S.; ABREU, J. M. G.; RIBEIRO FILHO, J. D.; MUZZI, L. A. L.; OLIVEIRA, H. P.; TANNUS, R. J.; BUCHANAN, T.; Efeitos do Ozônio nas Lesões de Reperusão do Jejuno em Equinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56, n.4, p.433-437, 2004.

BETTLE, M., NUSSING, R. M., MUTTERS, R., ZAMARA, Z. B., MENENDEZ, S. SHULZ, S. Efficiency of Tazobatan/Pireracillim in Lethal Peritonitis is Enchanced After Preconditioning of Rats O3/O2 – Pneumoperitoneum. **Shock**, 2006 Jan; 25 (1): 23-9.

BOCCI V. Ozone as Janus: This Controversial Gas can be Either Toxic or Medically Useful. **Mediators of Inflammation**, 2004; 13:3.

BOCCI, V. **Ozone: A New Medical Drug**. Springer; 2nd Ed. 2011, p.215-230.

CANDIDO, L. C. **Nova Abordagem no Tratamento de Feridas**. Fonte: São Paulo; Editora Senac; 2001. P.282.

CHEN, G.Y; NUÑEZ, G. Sterile Inflammation: Sensing and Reacting to Damage. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 827-837, 2010.

DE SOUZA Y. M., FONTES B., MARTINS J. O., SANNOMIYAL P., BRITO G. S., YOUNES R. N., RASSLAN S. Evaluation of the Effects of Ozone Therapy in The Treatment of Intra-Abdominal Infection in Rats. **Clinics**. 2010; 65 (2): 195-202.

DI FILIPPO, C.; LUONGO, M.; MARFELLA, R.; FERRARACCIO, F.; LETTIERI, B.; CAPUANO, A.; ROSSI, F.; D'AMICO, M. Oxygen/Ozone Protects The Heart From Acute Myocardial Infarction Through Local Increase of Enos Activity and Endothelial Progenitor Cells Recruitment. *Naunyn Schmiedebergs. Arch Pharmacol* 2010, 382(3):287-291.

FAUVE, R. M.; JUSFORGUES, H.; HEVIN, B. Maintenance of Granuloma Macrophages in Serum-Free Médium. **J. Immunol. Methods**, v. 64, p.345-351, 1983.

Gultekin, F.A., Cakmak, G.K., Turkcu, U.O., Yurdakan, G., Demir, F.E.; Comert, M., "Effects of Oxidative Preconditioning on Liver Regeneration After Partial Hepatectomy In Rats", **J Invest Surg**, 26(5): 242-52 (October 2013).

IBAÑEZ O.M.; STIFFEL, C.; ROBEIRO, O.G.; CABRERA, W.; MASSA, S.. DE FRANCO, M.; Genetics Of Nonspecific Immunity: I. Bidirectional Selective Breeding of Lines of Mice Endowed With Maximal or Minimal Inflammatory Responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v.22, p.2555-2563, 1992.

KUNZ, A.; FREIRE, R. S.; ROHWEDDER, J. R.; DURAN, N.; MANSILLA, H.; RODRIGUEZ, J. Construção e Otimização de um Sistema para Produção e Aplicação de Ozônio em Escala de Laboratório. **Química Nova**, 22(3), 1999.

MACEDO, S.B.; CARDOSO, C.C. **The Use of Ozone in Dentistry**. 16º Campinas International Conclave 2005; 115.

NAGAYOSHI, M.; KITAMURA, C.; FUKUZUMI, T.; NISHIHARA, T.; TERASHITA, M. Efficacy of Ozone on Survival And Permeability of Oral Microorganismis. **Oral Microbol Immunol**. 2004; 19:240-6.

PEREIRA, M. T. C.; GARCIA, C. A. Eficácia da Ozonioterapia no Tratamento de Mastite Subclínica de Vacas em Lactação. **Vet. Not.**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 109-115, Ago.-Dez. 2006.

PEREIRA, M. T. C.; GARCIA, C. A. Eficácia da Ozonioterapia no Tratamento de Mastite Subclínica de Vacas em Lactação. **Vet. Not.**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 109-115, Ago.-Dez. 2006.

RODRIGUES, K. L.; CARDOSO, C. C.; CAPUTO, L. R. Cicatrizing and Antimicrobial Properties Of An Ozonized Oil From Sunflower Seeds. **Inflam Mopharmacology**. 2004; 12(3):261-70.

SCHULZ, S., HAUSSLER, V., MANDIC, R., HEVERHAGEN, J. T., NEUBAUER, A., DUNE, A. A., WERNER, J. A., BETTLE, M. Treatment with Ozone/Oxygen – Pneumoperitoneum Results in Complete Remission of Rabbit Squamous Cell Carcinomas. **Int J Cancer**. 2008 May 15; 122 (10): 2360-7.

STIFFEL, C.; IBAÑES, O.M.; RIBEIRO, O.G.; DECREUSEFOND, C.; MOUNTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetic Acute Inflammation Reactions in Inbred Lines of Mice and their Interline Crosses. **Exp. Clin. Immunogenetics**, V.7, P.221-233, 1990.

Zamora, Z.B.; Borrego, A. López, O. Y., Delgado, R., González, R., Menéndez, S., Hernández, F., Shulz, S., “Effects Of Ozone Oxidative Preconditioning on Tnf-A Release And Antioxidant-Prooxidant Intracellular Balance in Mice During Endotoxic Shock”, **Mediators Inflamm.**, (1): 16-22 (February 2005).

4.2 Artigo 2

O artigo científico foi confeccionado seguindo as instruções aos autores estabelecidas pela Revista Ozone: Science & Engineering, obtido no site http://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?journalCode=bose20&page=instructions#.U9vKn_IdWSo

Efeito do Pré-Condicionamento Oxidativo com Oxigênio/Ozônio Terapia no Controle do Choque Endotóxico por Lipopolissacarídeo em Camundongos Geneticamente Selecionados

Wherick A. Bernadi¹, Andrea Borrego², Vinicius R. C. de Souza³, Clarisse S. Coelho^{4*}

Resumo

O pré-condicionamento oxidativo com a oxigênio/ozônio terapia é uma forma de equilibrar o balanço redox celular e o sistema antioxidante previamente à exposição a um dano celular. As linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin foram obtidos por seleção gênica bidirecional respondendo para máxima e mínima resposta inflamatória aguda quando estimulados subcutaneamente com o Biogel. Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da oxigênio/ozônio terapia frente ao choque endotóxico induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *S. typhimurium* em animais da linhagem AIRmax e sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} (n=24), homozigotas para os alelos do gene *Slc11a1*. Observou-se que a concentração utilizada da mistura oxigênio/ozônio, assim como a sua via de aplicação não foram eficientes em modular os níveis das citocinas analisadas, quando comparados aos grupos controle. Esse estudo indica que as condições utilizadas no pré-condicionamento oxidativo com a mistura oxigênio/ozônio não foram eficazes nos animais selecionados para a alta resposta inflamatória aguda.

Palavras-chave: ozônio, camundongos, choque endotóxico, LPS.

Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

¹Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Vila Velha (UVV-ES)

² Profa. Dra. Laboratório Imunogenética Butantan, Instituto Butantan (IB-SP).

³ Dr, Médico Veterinário. Quality Especialidades Veterinárias, Vitória- ES

⁴Profa. Dra. Programa de Pós Graduação da Universidade Vila Velha (UVV-ES). Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Vila Velha, ES, 29102-770.

* Autor para correspondência: clarisse.coelho@uvv.br

Introdução

O ozônio medicinal é uma mistura gasosa que contém 95% de oxigênio e somente 5% de ozônio, por isso chamada de oxigênio/ozônio terapia. Apesar de serem apenas 5% de ozônio, estes são mais que suficientes para gerar seu efeito oxidativo. Essa mistura é produzida por meio de um gerador de ozônio medicinal conectado a um cilindro de oxigênio medicinal puro. Este aparelho é capaz de gerar uma descarga elétrica (barreira dielétrica) e aplicá-la no oxigênio (que tem 2 átomos de oxigênio), dissociando-o e fazendo surgir o ozônio, uma molécula de oxigênio unida a 1 átomo do mesmo gás (KUNZ *et al.*, 1999; CANDIDO, 2001; BOCCI, 2004).

De acordo com os estudos sobre o ozônio da Associação Brasileira de Ozonioterapia, o ozônio medicinal tem propriedades altamente bactericidas, fungicidas e antivirais (ABOZ, 2014). Outros trabalhos realizados demonstram que o ozônio auxilia como protetor de infarto do miocárdio uma vez que age incrementando a capacidade das hemácias no transporte de oxigênio (DI FILIPPO *et al.*, 2010) e outros problemas vasculares (BOCCI, 2011). Sua ação antisséptica (bactericida) foi descrita quando associado à água deionizada para tratamento de lesões periodontais de origem infecciosa (NAGAYOSHI *et al.*, 2004). Também foi descrito sua ação em lesões herpéticas (MACEDO e CARDOSO, 2005) e seu uso na prevenção e tratamento da mastite bovina em produções leiteiras (PEREIRA e GARCIA, 2006). O uso do óleo de sementes de girassol ozonizado já foi descrito no reparo tecidual após injúria traumática com resultados satisfatórios, pois aumenta os níveis de peróxido do óleo, agregando a ele maior capacidade de cicatrização (RODRIGUES *et al.*, 2004). Em equinos, aumenta a capacidade de oxigenação sanguínea em lesão de reperfusão em jejuno (ALVES, 2004); e até mesmo seu uso para tratamento de infecção abdominal em ratos (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Sabe-se que a mistura oxigênio/ozônio ativa as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), p.ex., o superóxido (O_2^-), que aumentam o metabolismo celular, sendo responsáveis por ativar moderadamente as células mononucleares do sistema imune promovendo a liberação de algumas citocinas como IL-1beta, IL-2, IFN- γ , TNF-alfa e TGF-beta) (BOCCI, 2011). Entretanto, os EROs são responsáveis por promover danos no DNA, RNA e proteínas, liberando o átomo de ferro (Fe) do interior das enzimas

(desidratases), causando danos às suas estruturas. Uma das formas do organismo se proteger da ação deletéria do superóxido é através da enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (BOCCI, 2011).

Ao ser absorvido, a mistura de gases leva a redução de algumas citocinas pró-inflamatórias, aumento das enzimas SOD e Glutathione Peroxidase (GPx), atuando assim como modulador da resposta inflamatória. A GPx é uma enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, fazendo parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular e defesa endógena neutralizante de radicais livres (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Os estudos relacionados ao choque endotóxico afirmam que se administrando o LPS de *Salmonella typhimurium* por via IV é possível gerar o choque endotóxico e em 40 minutos alterações podem ser observadas em células hepáticas.

Zamora *et al.* (2005) avaliaram os efeitos do pré-condicionamento oxidativo com oxigênio/ozônio terapia aplicada cinco dias previamente à indução do choque endotóxico com LPS de *Escherichia coli* em camundongos. Estes observaram redução significativa nos níveis séricos de TNF-alfa quando comparados com o grupo que não recebeu tratamento algum.

Visando contribuir com novas informações sobre os efeitos na inflamação da oxigênio/ozônio terapia, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do pré-condicionamento oxidativo com oxigênio/ozônio terapia no controle do choque endotóxico por lipopolissacarídeo em camundongos geneticamente selecionados para a máxima resposta inflamatória, das linhagens AIRmax e AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}.

Materiais e Métodos

O presente projeto de pesquisa teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUA-IB), sendo registrado o protocolo de número 1243/14.

Camundongos das linhagens AIRmax (n=16) e sublinhagens AIRmax^{RR} (n=4) e AIRmax^{SS} (n=4), criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan (IB), todos machos, foram utilizados no experimento. Estes pesaram em média 25 gramas e apresentavam de 2-4 meses de idade.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com no máximo cinco camundongos/caixa, em ambiente com temperatura, luminosidade e umidade controladas, respeitando-se o ciclo circadiano de 12 horas. Alimentação e água foram mantidas “*ad libitum*” e diariamente os animais foram examinados. Qualquer alteração durante o tratamento foi registrada.

Os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos: G-LPS C (choque endotóxico controle) e G-LPS-T (tratamento).

Choque endotóxico de LPS

No G-LPS-T (n = 8 AIRmax; 2 AIRmax^{RR} e 2 AIRmax^{SS}), o choque endotóxico (injeção de 0,2µg/0,2mL por via intravenosa LPS de *S. typhimurium*) foi induzido 24 horas após a última aplicação da mistura gasosa. Após 40 minutos foram eutanasiados em câmara de CO₂. O fígado desses animais foi coletado para extração de RNA e análise da expressão gênica de *Tnf* (Fator de Necrose Tumoral), *Il1b* (Interleucina 1Beta), *Il6* (Interleucina 6) e *Il10* (Interleucina 10) por PCR (Reação em Cadeia Polimerase) em tempo real (RT-PCR).

O grupo controle (G-LPS-C, n = 8 AIRmax; 2 AIRmax^{RR} e 2 AIRmax^{SS}) não foi realizado o pré-condicionamento oxidativo com o ozônio; somente a aplicação do LPS por via IV.

O RNA total das células do fígado foi extraído segundo protocolo estabelecido pela empresa química GE Healthcare, na utilização do kit Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit. A concentração de cada amostra foi determinada pelo aparelho de espectrofotometria NanoVue® GE Healthcare e a

qualidade (RIN – *RNA Integrity Number*) do RNA obtido, foi analisada através do aparelho Bioanalyzer® Agilent 2100, seguindo o protocolo fornecido pelo próprio fabricante.

Com o auxílio do kit contendo a SuperScript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase – Invitrogen o DNA complementar (cDNA) foi confeccionado e as reações foram incubadas em aparelho Termociclador MJ Research PTC 200.

Análise da expressão de citocinas inflamatórias por RT-PCR

Para a amplificação dos cDNAs dos genes *B2m*, *Ppia*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tnf*, *Ifng*, (conforme descrito no *Mouse Genome Informatics*), utilizaram-se as seqüências sintéticas (*primers*) listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Seqüência de *primers* utilizados na síntese de mRNA.

Primer	Sense	Anti-sense
<i>B2m</i>	TGACCGGCTTGATGCTATC	CAGTGTGAGCCAGGATATAG
<i>Ppia</i>	AGCGTTTTGGGTCCAGGAAT	AAATGCCCGCAAGTCAAAG
<i>Il1b</i>	TTGACGGACCCCAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTIONCAGGTAGCTATGG
<i>Il10</i>	ATGCAGGACTTTAAGGGTACTTG	TAGACACCTTGGTCTTGGAGCTTA
<i>Tnf</i>	TCTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC

A cada amostra de 2µL do cDNA foi adicionada a uma solução contendo as seqüências sintéticas específicas ou *primers* (0,4µl de cada *primer* a 5 µM); 5,0µL de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 2,2µL de água para ajustar o volume final de reação em 10µL por tubo.

As reações foram incubadas no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems®) e submetidas ao protocolo de 95°C por 20 segundos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos.

Os resultados foram analisados no StepOne software v2.3. A quantidade de citocinas em cada amostra foi expressa através dos valores do *Cycle Threshold* (Ct). Para quantificar os resultados obtidos pelo qPCR utilizamos o Método do Threshold Comparativo (GIULIETTI *et al.*, 2001 e LIVAK *et al.*, 2001 e 2008).

Análise estatística

Admitiu-se que os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Já o desequilíbrio dos genes utilizados para o qPCR foi calculado pelo teste de Qui-Quadrado. A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 5.

Resultados

Na análise clínica dos animais não foi observada qualquer alteração que pudesse influenciar nos resultados como animal apático ou até mesmo que tenha vindo ao óbito antes do período estipulado para eutanásia.

Utilizamos as linhagens AIRmax, AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Para todos os animais foi seguido mesmo protocolo de aplicação e análise dos dados, sempre diferenciando o grupo controle (G-LPS-C) do tratamento (G-LPS-T). Os resultados da análise gênica foram dispostos de acordo com a citocina quantificada e estão demonstrados nas **Figuras 1a**. Pela análise estatística não houve diferença entre os grupos testados ($p < 0,05$).

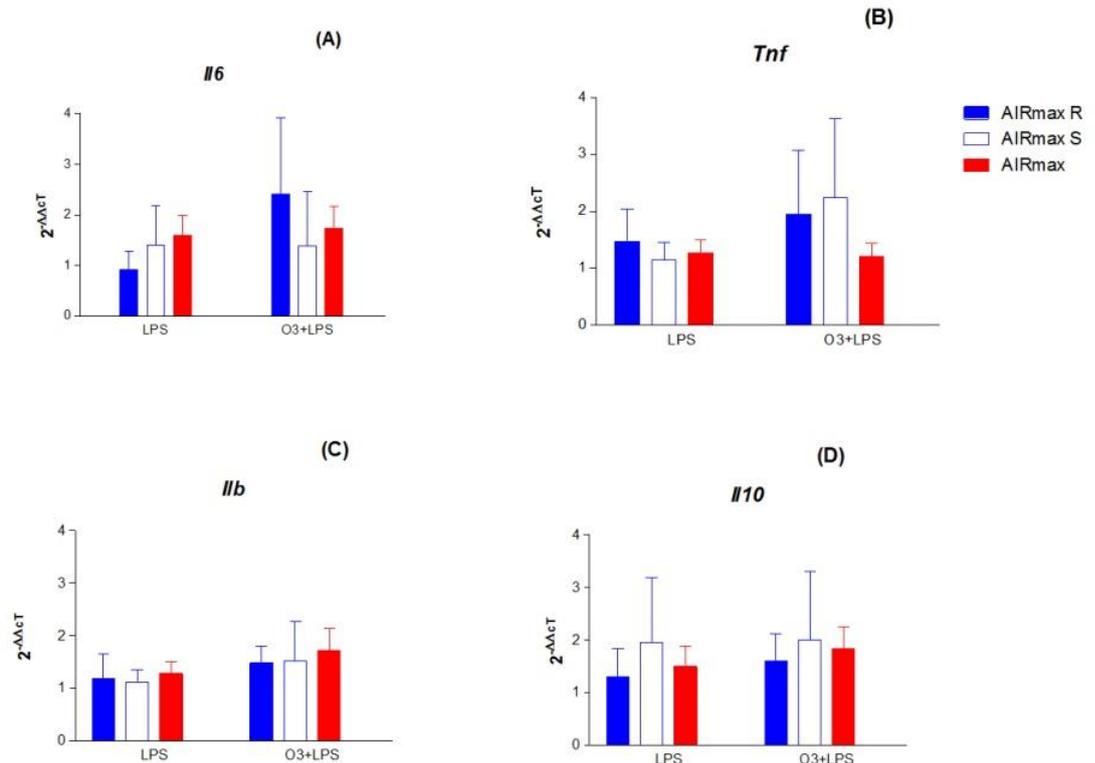


Figura 1a. Quantificação da expressão gênica para (A) *Il6*, (B) *Tnf*, (C) *Il1b* e (D) *Il10* em células do fígado de animais AIRmax, AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} que receberam somente o estímulo de 20 μg de LPS (G-LPS-C) e animais que receberam o pré-condicionamento com ozônio e posteriormente o estímulo de 20μg de LPS (G-LPS-T).

Discussão

De acordo com Bocci (2011), os materiais adequados para entrar em contato com a mistura gasosa sem que esta reaja de forma inadequada seriam as seringas livre de látex e seringa de vidro. Para aplicação da mistura gasosa nos animais foram utilizadas seringas livre de látex com capacidade de 3 mL.

A distensão abdominal causada pelo gás nos animais é momentânea, uma vez que a absorção dessa mistura gasosa pelo plasma sanguíneo se dá de forma rápida em aproximadamente 30 minutos (BOCCI, 2011). De acordo com estes mesmos autores que fizeram a administração intraperitoneal (De Souza *et al.*, 2010 e Di Filippo *et al.*, 2011), não se observou qualquer tipo de prostração do animal após a aplicação do gás ou desconforto durante a

aplicação feita de forma lenta. Este mesmo achado foi observado no presente pesquisa onde em nenhum dos grupos experimentais tratados com a mistura gasosa os animais apresentaram desconforto clínico. Este volume com a agulha especificada também é descrito como adequado pelo Manual do Comitê de Ética da FIOCRUZ (2013) como um volume adequado de aplicação em camundongos.

A aplicação intraperitoneal (quadrante lateral inferior direito) segue o modelo realizado nos trabalhos de Di Filippo *et al.* (2011) e De Souza *et al.* (2010) que avaliaram, respectivamente, os efeitos da aplicação da mistura oxigênio/ozônio por via intraperitoneal na redução de adesão peritoneal pós-cirúrgica e o efeito da mistura O₂/O₃ por via intraperitoneal no tratamento de infecção abdominal em ratos Wistar. Em ambos os trabalhos foi administrado a mistura O₂/O₃ com auxílio de uma agulha de baixo calibre (13x0,45mm; 26G ½) sem a utilização prévia de qualquer tipo de sedativo ou analgésico, uma vez que estes podem interferir nos resultados. Outros trabalhos foram realizados com a aplicação intraperitoneal da mistura O₂/O₃ sem o uso prévio de sedativos, anestesia ou qualquer tipo de controle da dor (SCHULZ *et al.*, 2008; BETTLE *et al.*, 2006), assim como no presente trabalho.

O trabalho de Schulz *et al.* (2008), realizado em coelhos, demonstrou os efeitos da mistura O₂/O₃ quando aplicado por via intraperitoneal levou a completa remissão de células tumorais de carcinoma de células escamosas. O grupo tratado com O₂/O₃ apresentou taxa de sobrevivência de 50% (7/14) enquanto o grupo que só recebeu oxigênio teve taxa de sobrevivência de 23% (3/13). Esperava-se na presente pesquisa uma resposta semelhante, com o ozônio atingindo a circulação sanguínea e gerando efeitos sobre a reação inflamatória aguda induzida pelo Biogel ou ao choque endotóxico induzido pelo LPS, entretanto isso não foi observado dentro do protocolo testado.

Diferentemente da presente pesquisa onde não foi observada diferença na expressão de TNF-alfa com o pré-condicionamento com a mistura de O₂/O₃, Zamora *et al.* (2005) descreveram uma inibição sérica dessa citocina, porém estes induziram o choque endotóxico com LPS aplicado por via intraperitoneal. Gultekin *et al.* (2013) também descreveram que o pré-condicionamento oxidativo pode aumentar o mecanismo de defesa antioxidante em ratos protegendo os da radiação que induz toxicidade aos órgãos. Em seu protocolo,

eles induziram o dano aos órgãos em ratos da linhagem Wistar por meio da radiação e aplicação pela via intraperitoneal 2,3 mL de O₂/O₃ na dose de 0,72mg/Kg, diariamente, por 5 dias consecutivos. Na presente pesquisa, a dosagem da mistura de oxigênio-ozônio foi superior em comparação com os pesquisadores supracitados, mas o fato de ser maior não significou eficácia. Já é sabido que uma dose excessiva de ozônio pode, além de desregular os mecanismos antioxidantes, lesionar diretamente a célula. Da mesma forma uma dose baixa seria insuficiente para gerar o mecanismo imunológico.

Segundo Zamora *et al.* (2005) a redução foi dose dependente (à medida que se aumenta a dose da mistura O₂/O₃ administrado há maior inibição sérica), visto que em seu experimento eles testaram o pré-condicionamento oxidativo em camundongos com doses diferentes. Um grupo recebeu a dose de 0,2 mg/Kg, outro recebeu de 0,4 mg/Kg e outro de 1,2 mg/Kg, cinco aplicações de cerca de 1mL por via intraperitoneal, com intervalo de 24 horas. Após 24 horas da última administração induziram o choque endotóxico com LPS de *Escherichia coli* por via intraperitoneal. Esse mesmo intervalo de aplicação da última mistura gasosa e o período de aplicação foi adotado na presente pesquisa. Essa padronização é essencial para a realização de estudos comparativos de diferentes doses da oxigênio/ozônio terapia em camundongos para confirmar tal processo em diferentes processos inflamatórios.

Este mesmo autor refere que utilizou animais da linhagem BALB/c e a aplicação do LPS de *E. coli* foi feito por via intraperitoneal. No presente trabalho, foram utilizados animais com fundo genético heterogêneo proveniente do cruzamento de oito linhagens de camundongos distintas e o LPS utilizado foi de cepa diferente (*S. typhimurium*) e a via de aplicação foi a IV. Estas diferenças citadas entre a via de aplicação, espécie de LPS, dose da mistura O₂/O₃ e a diferença entre os animais utilizados podem justificar as diferenças nos achados da presente pesquisa.

A dose de LPS escolhida para a presente pesquisa baseou-se na pesquisa de Borrego (2006) que testou as doses de 20 e 80 µg/200 µL. Com base neste experimento escolheu-se a dose de 20 µg de LPS.

DI FILIPPO *et al.*, 2011 induziu a formação experimental de adesões pós- cirúrgicas em ratos Wistar e iniciou o tratamento com 3 mL da mistura O_2/O_3 na dose de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e 3 mL de oxigênio puro no grupo controle 10 dias após a indução da adesão peritoneal. No grupo que recebeu somente o oxigênio observou-se que 7 dos 15 animais apresentavam o maior índice de adesões peritoneal, com impossibilidade de se acessar o abdome. Já no grupo que recebeu a mistura O_2/O_3 houve uma redução significativa na quantidade de adesões formadas, comprovando que a mistura gasosa foi aparentemente capaz de modular a resposta inflamatória, fato este que não pôde ser comprovado na presente pesquisa.

Em grande parte dos trabalhos (ZAMORA *et al.*, 2005; SCHULZ *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2010; DI FILIPPO *et al.*, 2011; GUTEKIN *et al.*, 2013) em que foi utilizada a mistura O_2/O_3 para tratamento de algum processo infeccioso ou não, através da aplicação intraperitoneal, sempre o ozônio foi apresentado de forma direta (mesma via) ao patógeno ou ao processo inflamatório, resultando assim em resultados favoráveis ao uso de tal tratamento tanto como ação pós-cirúrgica ou no pré-condicionamento oxidativo. Em todos os trabalhos analisados foram observados efeitos benéficos de tal terapia para controle da resposta inflamatória em animais isogênicos.

Esse foi o primeiro estudo realizado com o pré-condicionamento oxidativo de ozônio nos animais geneticamente selecionados para a resposta inflamatória aguda. E apesar de utilizar doses e períodos de administração já descritos na literatura para esse pré-condicionamento oxidativo, o mesmo não foi suficiente para reduzir os níveis de expressão gênica das citocinas *Tnf*, *Il1b*, *Il6* e *Il10* pós-inoculação de LPS.

Assim como discutido anteriormente sobre ação bactericida do ozônio quando exposto diretamente ao patógeno (via tópica) e demonstrado sua ação (PEREIRA e GARCIA, 2006; FONTES *et al.*, 2012), um dos possíveis motivos de não resposta na modulação do processo inflamatório mediante o pré-condicionamento com ozônio no LPS, seria pelo fato do patógeno (LPS de *S. typhimurium*) ter sido inoculado por via IV e ter sua ação sistêmica. Provavelmente caso as vias fossem as mesmas (de aplicação de LPS e do

O₂/O₃), o resultado poderia ter se assimilado mais ao que foi observado por Zamora *et al.* (2005).

Referências

Aboz, “Informações que a Sociedade Europeia de Ozonioterapia Recomenda Sejam dadas aos Pacientes”, Brasil (2014).

Alves, G.E.S., Abreu, J.M.G., Ribeiro Filho, J.D., Muzzi, L.A.L., Oliveira, H.P., Tannus, R.J., Buchanan, T., “Efeitos do Ozônio nas Lesões de Reperusão do Jejunum em Equinos”, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 56, 4:433-437 (2004).

Bettle, M., Nussing, R.M., Mutters, R., Zamara, Z.B., Menendez, S. Shulz, S. “Efficiency of Tazobatan/Pireracillim in Lethal Peritonitis is Enhanced After Preconditioning of Rats O₃/O₂ – Pneumoperitoneum”, **Shock**, 25 (1): 23-9. (January 2006).

Bocci V. “Ozone as Janus: This Controversial Gas can be Either Toxic or Medically Useful”, **Mediators of Inflammation**, 13:3 (2004).

Bocci, V. “Ozone: A New Medical Drug”, Springer; 2:215-230 (2011)

Borrego, A., Peters, L.C., Jensen, J.R., Ribeiro, O.G., Cabrera, W.H.K., Starobinas, N., Seman, M., Ibañez, O.M., De Franco, M., “Genetic Determinants of Acute Inflammation Regulate Salmonella Infection And Modulate Slc11a1 Gene (Formerly Nramp1) Effects In Selected Mouse Lines”, **Microbes Infect.**, 8:2766-2771 (2006).

Candido, L.C., “Nova Abordagem no Tratamento de Feridas”. São Paulo; **Senac**, 1:280-282 (2001).

De Souza, Y.M., Fontes, B., Martins, J.O., Sannomiyal, P., Brito, G.S., Younes, R.N., Rasslan, S., “Evaluation of the Effects of Ozone Therapy in The Treatment of Intra-Abdominal Infection in Rats”, **Clinics**, 65 (2): 195-202 (2010).

Di Filippo, C., Luongo, M., Marfella, R., Ferraraccio, F., Lettieri, B., Capuano, A., Rossi, F., D’amico, M., “Oxygen/Ozone Protects The Heart From Acute Myocardial Infarction Through Local Increase of Enos Activity and Endothelial

Progenitor Cells Recruitment. Naunyn Schmiedebergs”, **Arch Pharmacol**, 382(3):287-291 (2010).

Fiocruz. Manual De Utilização De Animais/Fiocruz. Trabalhos feitos.Com. Retirado 02, 2013, De [Http://Trabalhosfeitos.Com/Ensaio/Manual-De-Tiliza%C3%A7%C3%A3o-De_Animais--_Fiocruz/31354180.Html](http://Trabalhosfeitos.Com/Ensaio/Manual-De-Tiliza%C3%A7%C3%A3o-De_Animais--_Fiocruz/31354180.Html).

Gultekin, F.A., Cakmak, G.K., Turkcu, U.O., Yurdakan, G., Demir, F.E.; Comert, M., “Effects of Oxidative Preconditioning on Liver Regeneration After Partial Hepatectomy In Rats”, **J Invest Surg**, 26(5): 242-52 (October 2013).

Kunz, A., Freire, R.S., Rohwedder, J.R., Duran, N., Mansilla, H., Rodriguez, J., “Construção e Otimização de um Sistema para Produção e Aplicação de Ozônio em Escala de Laboratório”, **Química Nova**, 22(3) (1999).

Macedo, S.B., Cardoso, C.C., “The Use of Ozone in Dentistry”, 16º Campinas International Conclave, 115 (2005).

Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuzumi, T., Nishihara, T., Terashita, M., “Efficacy of Ozone on Survival And Permeability of Oral Microorganismis. **Oral Microbol Immunol**”, 19:240-6 (2004).

Pereira, M. T. C., Garcia, C. A., “Eficácia da Ozonioterapia no Tratamento de Mastite Subclínica de Vacas em Lactação”, **Vet. Not.**, 12(2):109-115 (August.-December. 2006).

Rodrigues, K. L., Cardoso, C. C., Caputo, L. R., “Cicatrizing and Antimicrobial Properties Of An Ozonized Oil From Sunflower Seeds”, **Inflam Mopharmacology.**, 12(3):261-70 (2004).

Schulz, S., Haussler, V., Mandic, R., Heverhagen, J. T., Neubauer, A., Dune, A. A., Werner, J. A., Bettle, M. “Treatment with Ozone/Oxygen – Pneumoperitoneum Results in Complete Remission of Rabbit Squamous Cell Carcinomas”, **Int J Cancer**. 122 (10): 2360-7 (May 2008)

Zamora, Z.B.; Borrego, A. López, O. Y., Delgado, R., González, R., Menéndez, S., Hernández, F., Shulz, S., “Effects Of Ozone Oxidative Preconditioning on

Tnf-A Release And Antioxidant-Prooxidant Intracellular Balance in Mice During Endotoxic Shock”, **Mediators Inflamm.**, (1): 16-22 (February 2005).

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a mistura oxigênio/ozônio aplicada pela via intraperitoneal, na dose e intervalo de administração utilizado, não foi eficaz em reduzir a resposta inflamatória aguda pelo Biogel.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- ABOZ. Informações que a Sociedade Europeia de Ozonioterapia Recomenda Sejam dadas aos Pacientes, Brasil, 2014.
- ADEREM, A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 340-345, 2003. suppl. 2.
- ALVES, G. E. S.; ABREU, J. M. G.; RIBEIRO FILHO, J. D.; MUZZI, L. A. L.; OLIVEIRA, H. P.; TANNUS, R. J; BUCHANAN, T.; Efeitos do Ozônio nas Lesões de Reperfusão do Jejuno em Equinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56, n.4, p.433-437, 2004.
- ARAÚJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M. Innate Resistance to Infection by Intracellular Bacterial Pathogens Differs in Mice Selected for Maximal or Minimal Acute Inflammatory Response. **Eur J Immunol**, v.28, p.2913 -2920, 1998.
- BELL, M. L.; MCDERMOTT, A.; ZEGER, S. L.; SAMET, J. M.; DOMINICI, F. Ozone and Short- Term Mortality In 95 us Urban Communities, 1987-2000. **Jama** 2004, 292(19):2372-2378.
- BETTLE, M., NUSSING, R. M., MUTTERS, R., ZAMARA, Z. B., MENENDEZ, S. SHULZ, S. Efficiency of Tazobatan/Pireracillim in Lethal Peritonitis is Enchanced After Preconditioning of Rats O3/O2 – Pneumoperitoneum. **Shock**, 2006 Jan; 25 (1): 23-9.
- BEUTLER, B.; MILSARK, I.W.; CERAMI, A.C. Passive Immunization Against Cachectin/Tumor Necrosis Fator Protects Mice From Lethal Effect Of Endotoxina. **Science**, V. 229, P. 869-871, 1985.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O.G.; SARAN, A.; ARAUJO, L.M.M.; MARIA, D.A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W.K.; SANT'ANNA, O.A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O.M. Effect of Genetic Modification of Acute Inflammatory Responsiveness on Tumorigenesis In The Mouse. **Carcinogenesis**, V.19 N.2, P.337, 1998.

BOCCI, V. Oxygen-Ozone Therapy. A Critical Evaluation. 2^a Ed.; 2002.

BOCCI V. Ozone as Janus: This Controversial Gas can be Either Toxic or Medically Useful. **Mediators of Inflammation**, 2004; 13:3.

BOCCI, V. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. Review Article Department of Physiology, **Archives Of Medical Research University of Siena**: Italy, v. 37, p. 425–435, 2006.

BOCCI, V. Is It True That Ozone Is Always Toxic? The End of the Dogma. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2006, 493-504.

BOCCI, V. **Ozone: A New Medical Drug**. Springer; 2nd Ed. 2011, p.215-230.

BORREGO, A.; PETERS, L.C.; JENSEN, J.R.; RIBEIRO, O.G.; CABRERA, W.H.K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O.M.; DE FRANCO, M. Genetic Determinants of Acute Inflammation Regulate Salmonella Infection And Modulate Slc11a1 Gene (Formerly Nramp1) Effects In Selected Mouse Lines. **Microbes Infect.**, v.8, p.2766-2771, 2006.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. A General Classification of U-Shaped Dose- Response Relationships in Toxicology and their Mechanistic Foundations. **Hum Exp Toxicol** 1998, 17(7):353-364.

CANDIDO, L. C. **Nova Abordagem no Tratamento de Feridas**. Fonte: São Paulo; Editora Senac; 2001. P.282.

CANHAMERO, T.; REINES, B.; PETERS, L. C.; BORREGO, A.; CARNEIRO, P. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G.; JENSEN, J. R.; STAROBINAS, N.; IBAÑEZ, O. M., DE FRANCO. Distinct Early Inflammatory Events During Ear Tissue Regeneration in Mice Selected For High

Inflammation Bearing Slc11a1 R and S Alleles. **Inflammation**, 2011 Oct;34(5): 303-13.

CANHAMERO, T.; GARCIA, L. V.; DE FRANCO. Acute Inflammation Loci are Involved in Wound Healing in the Mouse Ear Punch Model. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, 2014 Set 1; (3): 582-591.

CHEN, G.Y; NUÑEZ, G. Sterile Inflammation: Sensing and Reacting to Damage. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 827-837, 2010.

CLAVO, B.; SANTANA-RODRIGUES, N.; LOPEZ-SILVA, S. M; DOMINGUEZ, E.; MORI, M.; GUTIERREZ, D.; HERNADEZ, M. A.; ROBAINA, F. Persistent Port-A-Cath(R)-Related Fistula And Fibrosis in a Breast Cancer Patient Successfully Treated With Local Ozone Application. **J Pain Symptom Manage**. 2012; 43:p.3-6

DE FRANCO, M.; PETERS, L. C.; CORREA, M. A.; GALVAN, A.; CANHAMERO, T.; BORREGO, A.; JENSEN, J. R.; GONÇALVES, J.; CABRERA, W. H.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; DRAGANI, T.; IBAÑES. Pristane-Induced Arthritis Loci Interact With The Slc11a1 Gene to Determine Susceptibility in Mice Selected for High Inflammation. **Plos One**. 5: 1-10, 2014

DE FRANCO, M.; CARNEIRO, P. S.; PETERS, L.; VORRARO, F., BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G., STAROBINAS, N.; CABRERA, W.; IBAÑEZ, O.; Slc11a1 (Nramp1) Alleles Interact With Acute Inflammation Loci to Modulate Wound-Healing Traits in Mice. **Mammalian Genome**, v.18,p.263-269, 2007.

DE SOUZA Y. M., FONTES B., MARTINS J. O., SANNOMIYAL P., BRITO G. S., YOUNES R. N., RASSLAN S. Evaluation of the Effects of Ozone Therapy in The Treatment of Intra-Abdominal Infection in Rats. **Clinics**. 2010; 65 (2): 195-202.

DENTENER, M.A.; VREUGDENHIL, A.C.E.; HOET, P.H.M.; VERNOOY, J.H.J. NIEMAN, F.H.M.; HEUMANN, D.; JANSSEN, Y.M.W.; BUURMAN, W.A. WOUTERS, E.F.M. Production of the Acute-Phase Protein Lipopolysaccharide-Binding Protein by Respiratory Type II Epithelial Cells: Implications for Local

Defense To Bacterial Endotoxins. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 23, p. 146-153, 2000.

DESHMANE, S.L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (Mcp-1): An Overview. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DI FILIPPO, C.; LUONGO, M.; MARFELLA, R.; FERRARACCIO, F.; LETTIERI, B.; CAPUANO, A.; ROSSI, F.; D'AMICO, M. Oxygen/Ozone Protects The Heart From Acute Myocardial Infarction Through Local Increase of Enos Activity and Endothelial Progenitor Cells Recruitment. *Naunyn Schmiedebergs. Arch Pharmacol* 2010, 382(3):287-291.

FAUVE, R. M.; JUSFORGUES, H.; HEVIN, B. Maintenance of Granuloma Macrophages in Serum-Free Médium. **J. Immunol. Methods**, v. 64, p.345-351, 1983.

FONTES, B.; HEIMBECKER, A. M. C.; BRITO, G. B.; COSTA, S. F.; HEIJDEN, I. M.; LEVIN, A. S.; RASSLAN. Effect Of Low-Dose Gaseous Ozone on Pathogenic Bacteria. **Infectious Diseases**, 2012, 12:358

FORTIER, A.; MIN, O. O.; FORBES, J.; LAM-YUK-TSEUNG, S.; GROS, P. Single Gene Effects in Mouse Models of Host: Pathogen Interactions. **J. Leukoc. Biol.**, v.77, p.868-877, 2005.

FREUDENBERG, M. A.; KEPPLER, D.; GALANOS, C. Requirement for Lipopolysaccharide-Responsive Macrophages In Galactosamine-Induced Sensitization To Endotoxin. **Infect Immun**, v.51, p.891-895, 1996.

FRITSCHIA, G.; NAIRZA, M.; THEURLA, I.; MAIRA, S. BELLMANN-WEILERA, R.; BARTONB, H.C.; WEISS, G. Modulation Of Macrophage Iron Transport by Nramp1 (Slc11a1). **Immunobiology**, v.212, p.751-757, 2008.

GOÑI-URRIZA, M., PINEAU, L., CAPDEPUY, M., ROQUES, C., CAUMETTE, P., QUENTIN, C. Antimicrobial Resistance of Mesophilic Aeromonas Spp.

Isolated From Two European Rivers. **J. Antimicrob. Chemother.** (2000) 46 (2): 297-301.

HEUMANN, D.; ROGER, T. Initial Responses to Endotoxins and Gram-Negative Bacteria. [Review] **Clin Chim Act**, v.323, p.59-72, 2002.

HIEMSTRA, P.S.; EISENHAUER, P.B. HARWIG, S.S.L.; VAN DEN BARSELAAR, M.T.; VAN FURTH, R.; LEHER, R.I. Antimicrobial Proteins of Murine Macrophages. **Infect. Immun.**, v.61, p. 3038-3046, 1993.

HOLST, O.; ULMER, A. J.; BRADE, H.; HANS-DIETER, F.; RIETSCHER, E. Th. Biochemistry and Cell Biology of Bacterial Endotoxins. **Fems Immunol and Med Microb**, v.16, p.83-104, 1996.

IBAÑEZ O.M.; STIFFEL, C.; ROBEIRO, O.G.; CABRERA, W.; MASSA, S.. DE FRANCO, M.; Genetics Of Nonspecific Immunity: I. Bidirectional Selective Breeding of Lines of Mice Endowed With Maximal or Minimal Inflammatory Responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v.22, p.2555-2563, 1992.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Índices Teóricos Da Radiação UV-B, Para As Cidades Brasileiras.** 2006. [Http://Www.Dge.Inpe.Br/Ozonio/Radiauvb.Htm](http://www.dge.inpe.br/Ozonio/Radiauvb.htm). Acessado em Janeiro de 2014.

JENSEN, J. R.; PETERS, L. C.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. C.; DE FRANCO, M. Involvement of Antibody Production Quantitative Trait Loci in The Susceptibility to Pristane-Induced Arthritis in the Mouse. **Genes Immun.**, v. 7, p. 44-50, 2006.

JERRETT, M.; BURNETT, R. T.; POPE, C. A.; ITO, K.; THURSTON, G.; KREWSKI, D.; SHI, Y.; CALLE, E.; THUN, M. Long-Term Ozone Exposure and Mortality. **N. Engl. J. Med.** 2009, 360 (11):1085-1095.

JUNIOR, J. O. O.; LAGES, G. Ozonioterapia Em Lombociatalgia. **Rev Dor.** São Paulo: 13 (3), 261-70, 2012.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen Recognition With Toll-Like Receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 17, p. 338-344, 2005.

KUNZ, A.; FREIRE, R. S.; ROHWEDDER, J. R.; DURAN, N.; MANSILLA, H.; RODRIGUEZ, J. Construção e Otimização de um Sistema para Produção e Aplicação de Ozônio em Escala de Laboratório. **Química Nova**, 22(3), 1999.

MACAULEY, J. J., QIANG, Z., ADAMS, C. D., SURAMPALLI, R., MORMILE, M. R. Desinfection of Swine Wastewater Using Chlorine, Ultraviolet Light and Ozone. **Water Research** 40 (2006): 2017-2026.

MACEDO, S.B.; CARDOSO, C.C. **The Use of Ozone in Dentistry**. 16º Campinas International Conclave 2005; 115.

MAGALHÃES, P.O.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T.C.V.; PESSOA, A.JR. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: A Review. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci**, V.10, P.388-404, 2007.

MAIO, L.D.; URRUCHI, W.I. **Ozone Therapy In Medicine Veterinary**. 5to Simposio Internacional de Aplicaciones Del Ozono. Ciudad De La Habana 2007.

MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, F.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; BARRERA, R. G.; PETTINICCHIO, A.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T. A.; IBAÑEZ, O. M. Pulmonary Adenoma Susceptibility 1 (Pas1) Locus Affects Inflammatory Response. **Oncogene**, v.22,n.3,p.426-432, 2003.

MANDHARE, M.N.; JAGDALE, D.M.; GAIKWAD, P.L.; GANDHI, P.S.; KADAN, V.J. The Miracle of Ozone Therapy as an Alternative Medicine. **Intern Jour Of Fam, Chem And Biol Sci**. 2012, 2(1), 63-71.

MOLLER, B.; VILLIGER, P.M. Inhibition of IL-1, IL-6 and Tnf- α in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. Springer **Semin. Immunol.**, v. 27, p. 391-408, 2006.

NAGAYOSHI, M.; KITAMURA, C.; FUKUZUMI, T.; NISHIHARA, T.; TERASHITA, M. Efficacy of Ozone on Survival And Permeability of Oral Microorganisms. **Oral Microbiol Immunol**. 2004; 19:240-6.

NATHAN, C. Points Of Control In Inflammation. **Nature**, v. 420, p. 19-26, 2002.

NOGALES, C.G.; FERRARI, P.H.; KANTOROVICH, E.O.; LAGE MAQUES, J.L. Ozone Therapy in Medicine And Dentistry. **J Cont Dent Prac.** 2008 May 1;9(4):1-9.

OESPER, R. E. (1929). "Christian Friedrich Schönbein". **Journal Of Chemical Education** 6 (3): 432–440.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor Necrosis Factor-A Signaling In Macrophages. Crit. Ver. Eukaryot. **Gene Expr.**, v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010.

PEREIRA, M. T. C.; GARCIA, C. A. Eficácia da Ozonioterapia no Tratamento de Mastite Subclínica de Vacas em Lactação. **Vet. Not.**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 109-115, Ago.-Dez. 2006.

PERRETI, M. Endogenous Mediators That Inhibit The Leukocyte-Endothelium Interaction. **Trend Pharmacol Sci.**, v. 18, p. 418-425, 1997.

PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; BORREGO, A.; CABRERA, W. H.; BAKER, N.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Slc11a1 (Formerly Nramp1) Gene Modulates Both Acute Inflammatory Reactions and Pristane-Induced Arthritis in Mice. **Genes and Immunity**, v.8,n.1,p.51-56, 2007.

PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin Removal From Protein Solutions. **J. Biotechnol**, v. 76, p.97-119, 2000.

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O. M.; SEMAN, M. Convergent Alteration Of Granulopoiesis, Chemotactic, and Neutrophil Apoptosis During Mouse Selection for High Acute Inflammatory Response. **J Leukc Biol**, v.74,n.4,p.497-506, 2003.

RIETSCHEL, E. TH.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U. Bacterial Endotoxin: Molecular Relationships of Structure to Activity and Function. **Faseb J**, V.8, P.217-225, 1994.

RIETSCHEL, E.T.; BRADE, H.; HOLST, O.; BRADE, L.; MULLER-LOENNIES, S.; MAMAT, U.; ZHRINGER, U.; BECKMANN, F.; SEYDEL, U.;

BRANDENBURG, K.; ULMER, A.J.; MATTERN, T.; HEINE, H.; SCHLETTER, J.; LOPPNOW, H.; SCHONBECK, U.; FLAD, H.D.; HAUSCHILD, S.; SCHADE, U.F.; DI PADOVA, F.; KUSUMOTO, S.; SCHUMANN, R.R. Bacterial Endotoxin: Chemical Constitution, Biological Recognition, Host Response and Immunological Detoxification. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.26, p.256-274, 1996.

RIJAL, G. K., ZMUDA, J. T., GORE, R., ABEDIN, Z., GRANATO, T., KOLLIAS, L., LANYON, R. Antibiotic Resistant Bacteria in Wastewater Processed by the Metropolitan Water Reclamation District Of Greater Chicago System. **Water Sci Technol**. 2009; 59(12):2297-304.

ROCK, K.L.; LATZ, E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H. The Sterile Inflammatory Response. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 28, p. 321-42, 2010.

RODRIGUES, K. L.; CARDOSO, C. C.; CAPUTO, L. R. Cicatrizing and Antimicrobial Properties Of An Ozonized Oil From Sunflower Seeds. **Inflam Mopharmacology**. 2004; 12(3):261-70.

RYAN, G.B.; MAJNO, G. Acute Inflammation. A Review. **Am. J. Pathol.**, v.86, n. 1, p. 183-276, 1977.

SCHULZ, S., HAUSSLER, V., MANDIC, R., HEVERHAGEN, J. T., NEUBAUER, A., DUNE, A. A., WERNER, J. A., BETTLE, M. Treatment with Ozone/Oxygen – Pneumoperitoneum Results in Complete Remission of Rabbit Squamous Cell Carcinomas. **Int J Cancer**. 2008 May 15; 122 (10): 2360-7.

SERHAN, C.N. A Search For Endogenous Nechanisms Of Anti-Inflammation Uncovers Novel Chemical Mediators: Missing Links to Resolution. **Histochem. Cell Biol.**, v. 122, p. 305-321, 2004.

SHIU, C.-J., S. C. LIU, C.-C. CHANG, J.-P. CHEN, C. C. K. CHOU, C.-Y. LIN, AND C.-Y. YOUNG. "Photochemical Production of Ozone and Control Strategy for Southern Taiwan", **Atmos. Environ.**, 41, P9324-9340, 2007.

STIFFEL, C.; IBAÑES, O.M.; RIBEIRO, O.G.; DECREUSEFOND, C.; MOUNTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetic Acute Inflammation

Reactions in Inbred Lines of Mice and their Interline Crosses. **Exp. Clin. Immunogenetics**, V.7, P.221-233, 1990.

VAN AMERSFOORT, E.S.; VAN BERKEL, T.J.C.; KUIPER, J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16,n.3,p.3790414, 2003.

VIEBAHN-HAENSLER, R. **The Use Of Ozone In Medicine**. 4^a Ed.; 2002.

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. K.; ARAUJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R. P.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O.M.; DE FRANCO, M. Pristane-Induced Arthritis In Mice Selected For Maximal Or Minimal Acute Inflammatory Reaction. **Eur J Immunol**, V.30, P.431-437, 2000.

VORRARO, F.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G.; JENSEN, J. R.; DE FRANCO, M.; IBAÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. **Mediators Of Inflammation**, 2014, Article Id 952857,15p.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (Il-1) Pathway. **Sci Signal.**, v.3, n.105, p.1-6, 2010.

WOLFF, S. Aspects of the Adaptive Response to Very Low Doses Of Radiation and Other Agents. **Mutat Res** 1996, 358(2):135-142.

WYCKFF, T.J.O.; RAETZ, C.R.H.; JACKMAN, J.E. Antibacterial And Anti-Inflammatory Agentes that Target Endotoxina. **Trends Microbiol**, v.6, p. 154-159, 1998.

WYLLIE, P.S.; GOSS, J.A. The Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1 Slc1a1 (Formely Nramp1) And Iron Metabolismo In Macrophages. **Microbes Infect.**, v.4, p.351-359, 2002, Review.

ZWEIGNER, J.; SCHUMANN, R.R.; WEBER, JR. The Role of Lipopolysaccharide-Binding Protein in the Modulating the Innate Imune Response. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 946-52, 2006.