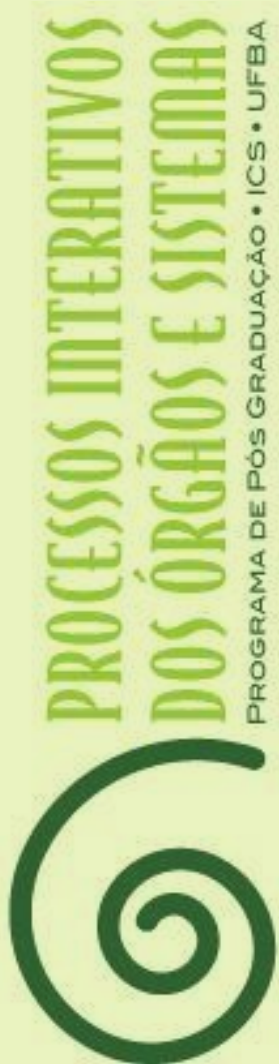


Sarah Souza Lima

Influência da Ozonioterapia
sobre o Infiltrado Inflamatório
Monomorfonuclear e Mastócitos no
Reparo Tecidual Cutâneo - Estudo
Experimental *in vivo*





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

SARAH SOUZA LIMA

**INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA SOBRE O INFILTRADO
INFLAMATÓRIO MONOMORFONUCLEAR E MASTÓCITOS NO REPARO
TECIDUAL CUTÂNEO – ESTUDO EXPERIMENTAL *IN VIVO***

Salvador
2023

SARAH SOUZA LIMA

**INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA SOBRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO
MONOMORFONUCLEAR E MASTÓCITOS NO REPARO TECIDUAL CUTÂNEO
– ESTUDO EXPERIMENTAL *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

Salvador
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI, pela Bibliotecária Maria de Fátima Martinelli CRB5/551, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L732 Lima, Sarah Souza

Influência da ozonioterapia sobre o infiltrado inflamatório monomorfonuclear e mastócitos no reparo tecidual cutâneo – estudo experimental *in vivo*/Sarah Souza Lima. – Salvador, 2023.

71 f.: il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, 2023.

Inclui referências e anexos.

1. Cicatrização. 2. Inflamação. 3. Ozônio. 4. Mastócito. I. Medrado, Alena Ribeiro Alves Peixoto. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616-002



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

SARAH SOUZA LIMA

INFLUÊNCIA DA OZONIOTERAPIA SOBRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E
MASTÓCITOS NO REPARO TECIDUAL CUTÂNEO - ESTUDO EXPERIMENTAL IN VIVO

Salvador, Bahia, 15 de dezembro de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF.ª DR.ª ALENA RIBEIRO PEIXOTO MEDRADO (EXAMINADORA INTERNA)

PROF.ª DR.ª GABRIELA BOTELHO MARTINS (EXAMINADORA INTERNA)

PROF. DR. TÉRCIO CARNEIRO RAMOS (EXAMINADOR EXTERNO)

Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela – Salvador/BA – CEP 40.110-100

Tel.: (71) 3283-8959 – E-mail: ppgorgsistem@ufba.br

Dedico a minha avó Iraci Vicente de Souza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me sustentar debaixo de sua infinita Graça em toda trajetória percorrida até aqui. Soli deo gloria.

À minha família pelo suporte: a minha mãe Roberta Teixeira, por sonhar os meus sonhos, ao meu pai Marcus Vinícius por ter trabalhado tanto para me prover educação, a minha avó Iraci Vicente por zelar por mim desde meu primeiro dia de vida.

Aos meus sogros Walter e Dóris Dantas, meus irmãos Lucas e Mariana Lima e meus cunhados Nuno Dantas e Mayra Martinez pelo apoio e incentivo.

Ao meu grande amor, Caio Nery Dantas por toda dedicação ao nosso projeto de vida, por toda parceria, por sempre ser meu porto seguro, sereno e firme nas adversidades.

Aos meus familiares, tias e primos, agradeço pelo entusiasmo e incentivo.

Agradeço também ao meu primeiro chefe, Nilson Teófilo por acreditar no meu potencial. a minha então colega de trabalho e hoje amiga Sueli Silva pelo incentivo desde a época da seleção. Também a toda equipe de colaboradores do Combo-RV pelo carinho.

Aos meus amigos de longa data, futuros doutores Julia Lima, Lian Zanatta e Paulo Cainan por estarem sempre ao meu lado, foram apoio fundamental na minha caminhada.

Agradeço aos meus colegas do PIOS, cada um à sua maneira me inspiram de forma única.

Agradeço em especial a minha orientadora Prof. Dra Alena Medrado, por toda dedicação e resiliência durante essa caminhada. Desde o nosso primeiro encontro, demonstrou empenho e entusiasmo em contribuir para minha formação acadêmica, me segurou pela mão e me ensinou tudo que sei sobre pesquisa e docência. Minha eterna gratidão.

Ao professor Dr Roberto Paulo, por ser uma inspiração de trabalho e força.

Ao professor Dr. Mauricio Cardeal sempre atreito a auxiliar em momentos cruciais.

Agradeço aos que contribuíram, de alguma forma, para o resultado final deste trabalho: Beatriz Paim e Carla Barreto, estas também fizeram a minha caminhada menos solitária.

A toda equipe do laboratório de Bioquímica oral do ICS da UFBA, por terem permitido a realização de etapas do trabalho, sem essas estruturas não seria possível.

Agradeço a disponibilidade e orientações dos funcionários da secretaria do PPGPIOS, Alisson, Carlos, Célia, Roniel e Tarcísio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“Porque o SENHOR dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento”

Provérbios 2.6

RESUMO

O reparo é um evento complexo que exige mobilização de diferentes células a fim de restaurar o tecido lesionado. A ozonioterapia tem sido utilizada a fim de contribuir para a resolução mais rápida do reparo. O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do ozônio, sob a forma de gás e óleo, na caracterização do infiltrado inflamatório monomorfonuclear e quantitativo de mastócitos. Tratou-se de um estudo experimental *in vivo* no qual Ratos *Wistar* foram submetidos à ozonioterapia como abordagem terapêutica para um ferimento cutâneo padronizado. Os espécimes foram alocados randomicamente em três grupos experimentais: Controle (GC), tratado com Gás ozônio (GGO) e tratado com Óleo Ozonizado (GOO) após a cirurgia cutânea, por três dias consecutivos. Os animais foram sacrificados nos 5º e 10º dias. Foi realizada análise histomorfométrica em secções teciduais coradas com HE e Azul de Toluidina, para análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório monomorfonuclear e histomorfométrica dos mastócitos, respectivamente. Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa no tocante ao infiltrado inflamatório monomorfonuclear entre os grupos em ambos os períodos do estudo ($p > 0,05$). Houve crescente aumento do número de mastócitos, intactos e desgranulados nos grupos tratados em relação ao controle (GGO $P=0,0003$; GOO $p=0,004$). Os resultados apresentados ratificam que embora a ozonioterapia não tenha modulado o infiltrado inflamatório monomorfonuclear nos períodos avaliados, influenciou a participação dos mastócitos em etapas mais tardias do reparo, sugerindo assim uma aparente modulação da atividade funcional destas células.

Palavras-chave: Cicatrização, Inflamação, ozônio, mastócito.

**INFLUENCE OF OZONE THERAPY ON MONOMORPHONUCLEAR
INFLAMMATORY INFILTRATE AND MAST CELLS IN WOUND HEALING –
EXPERIMENTAL STUDY *IN VIVO***

ABSTRACT

Tissue repair is a complex event requiring different cell mobilization to restore the injured tissue. Ozone therapy has been used to contribute to faster resolution of the repair. The objective of the present study was to analyze the effects of ozone, as gas and as ozonated oil, on the characterization of the monomorphonuclear inflammatory infiltrate and mast cells. This was an *in vivo* experimental study in which Wistar rats were subjected to ozone therapy as a therapeutic approach for a standardized skin wound. The specimens were randomly allocated into three experimental groups: Control (CG), treated with ozone gas (GGO), and treated with Ozonated Oil (GOO) after cutaneous surgery, for three consecutive days. The animals were sacrificed on the 5th and 10th days. Histomorphometric analysis was performed on tissue sections stained with HE and Toluidine Blue, for semiquantitative analysis of the monomorphonuclear inflammatory infiltrate and histomorphometric analysis of mast cells, respectively. It was observed that there was no statistically significant difference regarding monomorphonuclear inflammatory infiltrate between the groups in both study periods ($p>0.05$). There was an increase in the number of intact and degranulated mast cells in the treated groups in comparison to the control (GGO $P=0.0003$; GOO $p=0.004$). The results confirm the participation of mast cells in the late stages of repair, thus suggesting an apparent modulation of the functional activity of these cells.

Keywords: Wound Healing, Inflammation, Ozone, Mast Cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Secção de pele que apresenta mastócitos dérmicos intactos (circulados em vermelho) e mastócitos com evidências de desgranulação (circulados em verde). Azul de Toluidina, 400 X.	23
Figura 2	Aspecto ilustrativo do mastócito intacto (A), mastócito sensibilizado pela imunoglobulina IgE liberando seus grânulos (B) e mastócito em evidente desgranulação (C).	26
Figura 3	MCs (setas) com diferentes densidades citoplasmáticas que exibem desgranulação em reação alérgica na derme. Azul de Toluidina. 400X.	31
Figura 4	Aspecto ilustrativo do mastócito sensibilizado pela imunoglobulina, IgE, em sequência liberando seus grânulos.	33
Figura 5	Análise histomorfométrica dos grupos experimentais. Registro de fotomicrografias de secções histológicas de pele de ratos Wistar representativa do ferimento cutâneo padronizado, nos períodos de 5 e 10 dias.	44
Figura 6	Análise histomorfométrica dos grupos experimentais. Registro de fotomicrografias de secções histológicas de pele de ratos Wistar representativa do ferimento cutâneo padronizado, nos períodos de 5 e 10 dias.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Registro do infiltrado inflamatório monomorfonuclear entre os grupos experimentais com respectivas medianas e intervalos interquartis.	41
Tabela 2	Registro do quantitativo de mastócitos, intactos e desgranulados nos diferentes grupos experimentais com respectivas medianas e intervalos interquartis.	42
Tabela 3	Registro Intergrupos e Intragrupos nos 5 e 10 dias do período pós operatório.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MC	Mastócito
AT	Azul de Toluidina
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
TGF	Transforming growth factor (fator de crescimento transformador)
FGF	Fibroblast growth factor (fator de crescimento fibroblástico)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (fator endotelial vascular)
TGF β	Transforming growth factor (fator de crescimento transformador beta)
bFGF	Fibroblast growth factor (fator de crescimento fibroblástico básico)
GC	Grupo Controle
GO	Grupo Ozônio Gás
GOO	Grupo Óleo ozonizado
SCF	<i>Stem cell factor</i> (fator de células tronco)
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2 - related factor 2</i> (fator nuclear eritrocitário 2)
EROs	Species reactive oxygen (Especies reactivas a oxígeno)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
SCF	<i>Stem cell factor</i> (Célula tronco)
PG	Prostaglandinas
TX	Tromboxanos
LTs	Leucotrienos
IL	Interleucinas
IL-6	Interleucina 6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	15
3	JUSTIFICATIVA	16
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1	ASPECTOS GERAIS DA CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTOS	17
4.2	PARTICIPAÇÃO DOS MASTÓCITOS NO REPARO TECIDUAL	21
4.2.1	Aspectos Gerais dos Mastócitos	21
4.2.2	Histórico	23
4.2.3	Origem	24
4.2.4	Métodos de Análise - Colorações Histoquímicas	25
4.2.5	Ações Biológicas	26
4.2.5.1	<i>Reparo Tecidual</i>	26
4.2.5.2	<i>Alergia</i>	30
4.2.5.3	<i>Neoplasias</i>	31
4.3	OZONIOTERAPIA E O REPARO TECIDUAL	34
5	METODOLOGIA	37
5.1	DESENHO DO ESTUDO	37
5.2	AMOSTRA DO ESTUDO	37
5.3	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E UTILIZAÇÃO DA TERAPIA BIOMODULADORA	37
5.4	MORTE DOS ANIMAIS	38
5.5	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	38
5.6	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	39
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6	RESULTADOS	40
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

O reparo tecidual envolve uma sequência de eventos moleculares e bioquímicos que culminam na cicatrização de uma determinada lesão. Pode ser desencadeado por diferentes agentes etiológicos de natureza física, química ou biológica. A cicatrização de feridas tem se constituído um desafio para as profissões de saúde em razão do crescente aumento de doenças crônicas e condições clínicas que requerem maior mobilização celular em variados tipos de tecido¹. Em particular, tem sido relatado na literatura que ferimentos com dificuldade cicatricial resultam em maior tempo de permanência de pacientes nos leitos hospitalares e representam maiores gastos de recursos financeiros, tanto por desembolso individual quanto pelo Sistema de Saúde de uma dada população².

O reparo é um evento complexo que compreende múltiplas etapas, nas quais diferentes tipos de células são ativadas. Em especial, os mastócitos (MCs) se destacam por participarem em todas as fases desse processo fisiopatológico. A fase inflamatória do reparo se inicia logo após o estabelecimento da lesão. Diversos mediadores pré-formados são liberados, entre eles a histamina proveniente de MCs residentes no tecido, a qual promove a vasodilatação e como consequência ocorre uma maior permeabilidade endotelial, viabilizando o recrutamento de outras células de defesa ao sítio da lesão³. Há biossíntese e liberação de substâncias vasodilatadoras além da histamina, como as prostaglandinas e outras aminas vasoativas decorrentes da desgranulação de MCs, além da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) - a exemplo do óxido nítrico produzido por células endoteliais e leucócitos⁴. A fase inflamatória ocorre mais intensamente até as primeiras 48 horas após a lesão e em sequência os eventos proliferativos e o infiltrado linfo-plasmocitário passam a predominar no microambiente da lesão. Um estudo conduzido por Egozi⁵ e colaboradores (2003) avaliou o relevante papel biológico desempenhado pelos MCs na fase inflamatória aguda, e observou que esses foram capazes de modular a transmigração tanto de células polimorfo quanto monomorfonucleares. Além dos MCs, a crescente diapedese de monócitos resulta em sua diferenciação no tecido como macrófagos, que secretam mediadores químicos recém-sintetizados, a exemplo das citocinas e fatores de crescimento⁶, entre eles TGF- α , TGF- β , VEGF, FGF, entre outros⁷.

A fase proliferativa é caracterizada por intensa proliferação celular e crescente biossíntese de novos constituintes da matriz extracelular (MEC) com o propósito de formar uma MEC provisória⁸. Nesse contexto, os MCs secretam fatores pró-angiogênicos, interleucina-8, além de proteases e heparina⁹. Já a fase de remodelamento consiste na reorganização da MEC recém-sintetizada. Ocorre um estímulo à biossíntese de colágeno tipo I, elastina e outros componentes fibrilares que são reorganizados e compactados a fim de atribuir força tênsil ao leito da cicatriz. No que diz respeito a essa fase do reparo, ainda há escassez de estudos que avaliaram a participação dos MCs.

Levando em consideração a ocorrência de agravos que impedem o reparo tecidual de forma eficaz, têm sido propostas abordagens terapêuticas biomoduladoras, dentre as quais se destaca a ozonioterapia, que se constitui no uso medicinal do ozônio, uma molécula alotrópica de oxigênio formada por três átomos desse elemento¹⁰. Os mecanismos através dos quais o ozônio é capaz de exercer seus efeitos terapêuticos incluem a melhora da oxigenação no tecido, a eliminação de produtos tóxicos gerados pelas células e a regulação de mecanismos imunológicos de defesa do organismo. Ademais, tem sido relatado que o ozônio tem propriedades bactericidas, antivirais, fungicidas, assim como estimuladoras da regeneração¹¹. Ao interagir com os ácidos graxos insaturados das membranas celulares, pode promover a formação de peróxidos hidrófilos que estimulam a produção de compostos desoxigenantes, os quais podem acelerar a degradação da oxihemoglobina e a liberação de oxigênio para os tecidos¹².

Diferentes formas de apresentação e vias de administração do ozônio têm sido propostas na literatura. Pode ser utilizado sob a forma de gás, associado a óleo, água ou nanopartículas¹³. Adicionalmente, pode ser aplicado por via retal, sublingual, auricular, subcutânea, intramuscular ou tópica, com utilização do gás e veículos ozonizados¹⁴.

Diante dos possíveis benefícios oriundos da ozonioterapia na cicatrização de ferimentos, urge a necessidade de se analisar os efeitos desse recurso terapêutico em modelos experimentais de cicatrização *in vivo*. Em particular, o presente estudo objetivou avaliar a ação da ozonioterapia sobre os MCs e sua relação com o processo inflamatório que se desenrola na MEC durante a cicatrização cutânea em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da ozonioterapia sobre o infiltrado inflamatório monomorfonuclear e mastócitos em um modelo experimental clássico de cicatrização cutânea *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o infiltrado inflamatório monomorfonuclear por meio de análise semiquantitativa em secções de pele que compreendem a área do ferimento induzido experimentalmente;

Identificar o quantitativo de mastócitos intactos e desgranulados em secções de pele coradas com Azul de Toluidina (AT) nos diferentes grupos experimentais;

Comparar as variáveis descritas em dois períodos distintos do reparo cutâneo em ratos pertencentes aos diferentes grupos experimentais;

Indicar qual dos métodos de aplicação do ozônio pode ter influenciado mais a inflamação e a desgranulação dos mastócitos durante a cicatrização cutânea em ratos.

3. JUSTIFICATIVA

O reparo de ferimentos representa um desafio comum a diferentes áreas das ciências da saúde, com variáveis determinadas pelo tipo da população afetada em razão de lesões decorrentes de traumas ou doenças pré-existentes¹⁵. Os ferimentos são caracterizados pela interrupção dos tecidos lesionados, e a regeneração tem como objetivo restabelecer a integridade morfológica e funcional das células envolvidas nesse processo⁴. Diante da existência de fatores complicadores do reparo, que impactam em custos financeiros elevados tanto por parte de pacientes quanto pelo sistema de saúde, novas propostas terapêuticas que incluem o uso de terapias biomoduladoras têm sido relatadas na literatura científica.

Nesse sentido, o emprego terapêutico do ozônio tem sido evidenciado com vistas a otimizar o reparo tecidual e biomodular os fenômenos biológicos complexos que caracterizam esse evento. Adicionalmente, através de seus efeitos microbicidas, a ozonioterapia pode ativar leucócitos que participam de relevantes respostas, tanto celulares quanto humorais, do sistema imunológico¹⁶. Considerando as feridas como limitantes e dispendiosas, o uso do ozônio tem sido considerado promissor em razão do baixo custo operacional envolvido em sua utilização e devido à escassez de estudos que avaliaram a sua ação *in loco* durante a cicatrização, em modelos experimentais *in vivo*.

Mais recentemente, Andrade¹⁷ e colaboradores (2022) analisaram cinco estudos experimentais que avaliaram o potencial terapêutico da ozonioterapia sobre o reparo tecidual, de forma isolada ou associada a outras terapias biomoduladoras. Em tais estudos, a ênfase está primariamente voltada para a caracterização do processo inflamatório. Contudo, até o momento, não foram identificados estudos na literatura que objetivaram analisar a influência da ozonioterapia sobre a inflamação crônica e a desgranulação de mastócitos.

Nesse contexto, o presente estudo permitiu avaliar o contingente dos mastócitos em duas fases específicas do reparo cutâneo em ratos submetidos ao tratamento com ozônio.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção da dissertação, são descritos os aspectos do reparo tecidual com ênfase na descrição dos mastócitos. Essas informações são derivadas de minuciosa pesquisa bibliográfica e constituem um capítulo de livro que será publicado pelo Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas (Anexo 1).

4.1. ASPECTOS GERAIS DA CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTOS

A cicatrização de lesões, sejam de origem traumática ou decorrentes de patologias, tem apresentado um crescente escopo de mobilização de esforços e recursos. As feridas de perfil crônico emergem como objeto de preocupação de interesse amplo na área da saúde, pois o indivíduo acometido por tais agravos têm probabilidade de ter maior tempo de hospitalização, bem como se torna mais suscetível a contrair infecções que podem levar a maiores prejuízos à sua saúde². O processo de reparo dessas feridas é complexo e envolve diferentes aspectos em cada uma de suas fases pois pode sofrer influência de comorbidades, apresentar retardo da cicatrização ou até mesmo progressão para uma lesão crônica¹⁸. No Brasil, a escassez de dados referentes a feridas crônicas se deve à subnotificação deste agravo no atendimento ao paciente, o que impede uma análise estatística ampla. Neste país, estima-se que cerca de 3% da população seja acometida por algum tipo de lesão cutânea com dificuldade cicatricial¹⁹.

Dentre os inúmeros fatores que podem influenciar na resposta esperada à cicatrização, destaca-se a Diabetes mellitus. Aproximadamente 500 milhões de pessoas sofrem atualmente com tal comorbidade, e uma parcela desses indivíduos pode desenvolver úlceras crônicas não-cicatrizantes. Ademais, a hiperglicemia contribui para que arteriosclerose se estabeleça, impedindo que os nutrientes circulantes alcancem a matriz extracelular das feridas e tem sido apontada como potencial causa de disfunções endoteliais²⁰. Além desta síndrome metabólica, a hipertensão arterial e condições que determina a ocorrência de isquemia, hipóxia, anemia, alterações hormonais e avitaminoses, repercutem sistematicamente e apresentam potencial de retardar o reparo e/ou desencadear uma resposta cicatricial anormal, e devem ser consideradas no manejo dos pacientes com feridas^{21,22}. A incidência de feridas crônicas, influenciada por

comorbidades, representa uma demanda para alocação de profissionais e recursos financeiros, sobretudo na saúde pública²³. Os insumos de medicamentos e curativos para otimizar o processo de cicatrização oneram o orçamento público em saúde, bem como demandam do paciente comprometimento no decorrer do tratamento e a cronificação dessas feridas é apontada como segunda causa de afastamento do trabalho²⁴.

O processo de cicatrização é dividido didaticamente em fases, que não necessariamente ocorrem em sequência e que muitas vezes, podem ser concomitantes. Inicialmente, ocorre a fase inflamatória aguda, na qual uma cascata de respostas vasculares é acionada, com consequente agregação de plaquetas e formação inicial de rede de fibrina. A formação do coágulo objetiva restabelecer a hemostasia, e organizar uma matriz provisória, que posteriormente viabilizará a migração e proliferação celular, eventos necessários para o reparo final da lesão¹⁵. A vasodilatação e a congestão representam alterações hemodinâmicas precoces que contribuem para a exsudação, e são primariamente estimuladas pela histamina e serotonina oriundas dos MCs, além do óxido nítrico proveniente das células endoteliais.

Em recente revisão integrativa, Raziyeva²⁵ et al., (2021) relatam que após a transmigração inicial dos neutrófilos, tais células realizam surto oxidativo e autólise e/ou heterólise ao chegar no local da lesão. Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa da resposta imune inata e a sua desgranulação é um evento característico da fase inflamatória aguda. Paralelamente, MCs residentes nas proximidades dos capilares reconhecem também sinais de lesão pois expressam receptores em suas membranas que amplificam a sinalização para o recrutamento de mais células inflamatórias para o microambiente que sofreu a agressão. Os autores comentam que, embora os MCs desempenhem ações efetoras em todas as fases do reparo, seus fenótipos e funções são regulados pelo ambiente em que está inserido.

Com o avanço do tempo, o infiltrado predominantemente polimorfonuclear passa a ceder lugar para as células monomorfonucleares. De fato, a própria matriz extracelular em formação oferece uma rede de sustentação para a crescente infiltração de células do sistema imune²⁶. No decorrer das primeiras 48 horas após a lesão inicial, a diapedese de monócitos se intensifica e estes, após a transmigração se diferenciam em subpopulações de macrófagos (M1 e M2) no interstício. Os macrófagos M1, em geral, expressam fenótipo pró-inflamatório com síntese de IL-12, IL-23 e IL-1. São também eficientes produtores de moléculas efetoras como os EROs e citocinas inflamatórias, tais como TNF-alfa e IL-6. Participam como células mediadoras da resistência contra parasitas e neoplasias a partir da indução de respostas efetoras do tipo Th1²⁷.

Os macrófagos M2 apresentam um perfil funcional voltado para a reconstrução do tecido lesado e liberam fatores de crescimento fundamentais para o processo de reparo, entre os quais procedem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador (TGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Tais proteínas são essenciais para a formação do tecido de granulação⁸.

Entre as células monomorfonucleares, destacam-se também as subpopulações de linfócitos. A infiltração de linfócitos T, é fundamental para o sucesso da cicatrização, ao passo que um atraso ou deficiência deste processo resulta em uma cicatrização ineficaz²⁸. O principal subtipo de células T envolvido nas fases iniciais da cicatrização de feridas são os Th1, tendo o IFN- γ como um mediador da polarização em direção ao fenótipo Th1. Em resposta, as células Th1 também produzem IFN- γ e mantêm as características pró-inflamatório no leito da ferida, promovendo a inflamação e inibindo a cicatrização do tecido. Além disso as células T CD8+ citotóxicas também estão envolvidas nos estágios iniciais da cicatrização aguda de feridas²⁶.

O subtipo Th2 atua no reparo. imunidade Th2 envolve as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que atuam em outras células e promovem a angiogênese, a contração da ferida, e a formação de uma nova barreira epitelial. Outro tipo de linfócito T CD4+ que desempenha um papel importante na cicatrização de feridas cutâneas e mucosas é o Th17 esse subtipo em específico, elimina patógenos, modula superfícies e ajusta a morfologia das células epiteliais. Citocinas específicas tais como IL-6, TGF- α e IL-1 β ativam o subtipo Th17. As células Th17, por sua vez, expressam TNF- α , IL-17 e IL-22, que aumentam a taxa de sobrevivência e proliferação e promovem a regeneração do tecido. O linfócito B se diferencia em plasmócitos que secretam anticorpos que vão contribuir para o aumento do grau de especificidade da resposta inflamatória²⁹.

Na fase proliferativa, forma-se uma matriz transitória representada pelo tecido de granulação, o qual é caracterizado pela presença de fibroblastos, fluido seroso residual, vasos sanguíneos recém-formados e colágeno tipo III. Dessa forma, a fase proliferativa é caracterizada pela substituição das estruturas especializadas com diferenciação dos tipos celulares inicialmente envolvidos no processo de cicatrização, e o estímulo para proliferação fibroblástica, iniciado nas primeiras horas da lesão é mantido até pelo menos, o 14 ° dia após o dano tecidual³⁰. Nesta fase, ocorre também a re-epitelização do ferimento através da migração de células epiteliais dos bordos da lesão³¹.

A fase final do processo de cicatrização cutânea é denominada remodelamento, e inicia-se de duas a três semanas após o estabelecimento da lesão. Essa fase tem como objetivo aumentar a força tênsil do tecido através da reorganização da matriz extracelular (MEC) com a maturação de seus constituintes estruturais. Sendo assim, ocorrem simultaneamente degradação e biossíntese de novos elementos da MEC, em especial das fibras colágenas, com progressivo espessamento e organização, para que seja conferido ao tecido maior resistência⁸.

O colágeno é o principal produto secretado pelos fibroblastos da matriz extracelular. Essa proteína é classificada estruturalmente como rígida, alongada e grande e tem como função conferir resistência, coesão e elasticidade ao tecido onde é encontrado. O colágeno é agrupado de acordo com sua estrutura e especialização e classificado como colágeno tipo I, II, III, V e XI que formam longas fibrilas; os tipos IX, XII e XIV são colágenos associados às fibrilas, ligadas umas às outras e à matriz extracelular; colágeno IV, formador de rede; e o colágeno tipo VII, considerado integrante da membrana basal e responsável pela ancoragem do tecido epitelial à matriz conjuntiva. O tipo III é encontrado em tecidos como a derme, fâscias e vasos sanguíneos, e o tipo I é mais encontrado em ossos e tendões¹.

No tecido conjuntivo propriamente dito, as células mais frequentes são os fibroblastos, e sua principal função é a síntese de moléculas que compõem a matriz extracelular, tais como: colágeno, elastina, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas. O colágeno está presente desde a fase inflamatória do reparo, atuando em conjunto com plaquetas e trombina na formação do coágulo, e servindo de reserva protéica para produção de citocinas e fatores de crescimento. Participa da fase proliferativa em um frouxo arranjo de colágeno do tipo III, e é parte integrante do tecido de granulação junto com fibroblastos, macrófagos, fibronectina e ácido hialurônico. Por fim, na fase de maturação, o colágeno tipo I é responsável por conferir força tênsil, com a remodelação do colágeno depositado anteriormente e crescente espessamento das fibras⁸.

No contexto do reparo tecidual, os mastócitos parecem exercer função chave na ativação de fibroblastos e contribuir indiretamente para a biossíntese de colágeno, por meio de uma variedade de mediadores químicos, que incluem citocinas, enzimas e fatores de crescimento como o fator derivado do crescimento de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGFβ) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF)⁸.

A formação de fibras elásticas envolve diferentes proteínas especializadas, entre elas a Fibrilina-1, glicoproteína da matriz extracelular que se organiza estruturalmente em conjunto e forma uma estrutura de microfibrilas ligada ao cálcio. Há também a tropoelastina, substância precursora da elastina que é secretada na superfície celular. Os glóbulos de elastina são

depositados em microfibrilas associados às proteínas para formar fibras elásticas. De acordo com Zhang³² et al., (2022), as Fibulinas 4 e 5 demonstram importância fundamental na formação da fibra elástica e são capazes de regular a automontagem da elastina. Segundo estes autores, a não expressão dessas proteínas acarreta em patologias relacionadas à estrutura tecidual deficiente como a síndrome da pele dura e prolapso da válvula mitral. A neoelastogênese tem início na fase proliferativa, mas a maturação das fibras elásticas requer mais tempo do que aquela observada nas fibras colágenas³³.

Diante do exposto, pode-se afirmar que todos os eventos citados que caracterizam o reparo tecidual revelam uma crescente complexidade. Esta tem sido explorada cada vez mais na literatura a fim de que se possa compreender melhor a inter-relação de todos os componentes da MEC.

4.2. PARTICIPAÇÃO DE MCS NO REPARO TECIDUAL

4.2.1 Aspectos Gerais dos Mastócitos

Após o estabelecimento de uma lesão, ou dano tecidual, uma sequência de eventos que envolvem diferentes vias de sinalização, células sanguíneas e componentes da matriz extracelular, é acionada com objetivo de restabelecer as funções do tecido que sofreu o dano. Neste contexto, destacam-se os MCs. Essas células desempenham distintas funções biológicas e estão presentes em praticamente todos os tecidos vascularizados. São responsáveis pela liberação de aminas vasoativas e biossíntese de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento^{34,35}. Sua morfologia é descrita na literatura como oval e apresenta diâmetro variável, de 8 a 20 µm, de acordo com o tecido em que está localizado³⁶.

Os MCs são conhecidos por desempenhar ações regulatórias de defesa imune. Esse tipo celular é recrutado mediante estímulos quimiotáticos como primeira resposta à lesão, e participa de reações inflamatórias, de hipersensibilidade e combate às infecções bacterianas e parasitárias ou às substâncias exógenas, como drogas, alimentos e picadas de insetos³⁷. Os MCs são células móveis, com origem na medula óssea, que são recrutados a um local específico no qual o processo de desgranulação é ativado. Normalmente, encontram-se localizados próximos aos capilares e vasos sanguíneos de maior calibre e integram a resposta inflamatória inicial que é caracterizada pela intensa transmigração de neutrófilos³⁸. Essa ação biológica representa apenas

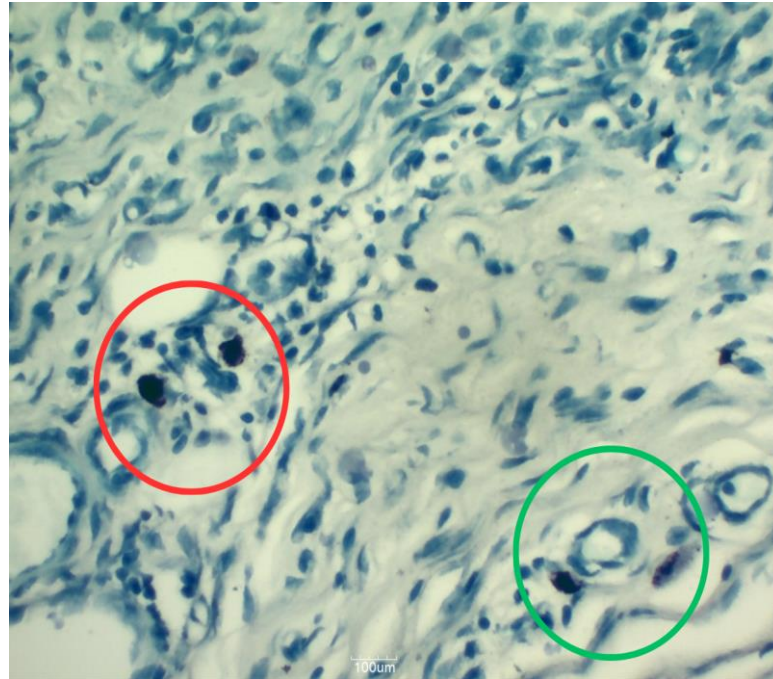
um dos mecanismos por meio dos quais o MC pode agir como regulador do sistema imunológico.

A distribuição dessas células nos diferentes tecidos conectivos é abundante, em especial na derme e nas mucosas dos tratos gastrointestinal e respiratório. Os mastócitos migram para tecidos periféricos, onde finalizam seu processo de maturação e diferenciação, de acordo com o microambiente no qual estão inseridos. Quando esse estágio de maturação acontece, o fenótipo apresentado pela célula pode variar, pois, uma vez aderidos ao tecido conjuntivo, podem apresentar forma mais alongada, ao passo que, isolados, costumam exibir forma mais arredondada³⁹. Estabelecem, por meio de receptores celulares específicos, contato com os constituintes estruturais da matriz extracelular, assim como com algumas células que ali se encontram constitutivamente presentes.

Dentre suas características estruturais, destaca-se o núcleo grande, centralizado e redondo, que pode apresentar dois ou mais nucléolos. Em seu citoplasma, podem ser visualizados inúmeros grânulos eletrodensos, e sua membrana citoplasmática apresenta microvilos finos^{40,41}. Ademais, o mastócito maduro pode apresentar formato oval, poligonal ou fusiforme, e é uma célula relativamente grande, com dimensão média em torno de 15 a 20 μm ⁴². Os grânulos presentes em seu citoplasma apresentam dimensões ainda menores, de 0,2 a 1,5 μm , e ocupam de 0 a 55% do total da área do citoplasma e se distribuem em meio às organelas. Do ponto de vista ultraestrutural, tais grânulos, presentes no interior do mastócito, apresentam diferentes formas, podendo ser particulados ou espiralados⁴³.

Devido à característica de síntese e secreção de diferentes mediadores químicos, esse tipo celular é conceituado como uma célula metabolicamente ativa e capaz de exercer um papel biológico essencial em diferentes contextos⁴⁴. Os MCs podem se apresentar por meio de um agrupamento heterogêneo de células, com estágios distintos de maturação e morfologia variada, de acordo com sua atuação, conteúdo granuloso e mediadores químicos secretados (Figura 1).

Figura 1 – Secção de pele que apresenta mastócitos dérmicos intactos (circulados em vermelho) e mastócitos com evidências de desgranulação (circulados em verde). Azul de Toluidina, 400 X.



Fonte: autoria própria.

Sua localização estratégica perivascular pode estar relacionada à proximidade de contato com patógenos e antígenos ambientais. O MC pode apresentar diferenças relevantes na sensibilidade aos patógenos, que estimulam a liberação de mediadores químicos. Dessa mesma forma, pode responder aos fármacos que competem pelos mesmos receptores, ou bloquear mecanismos de ação da histamina ou de algum de seus mediadores químicos ou enzimas⁴⁵.

O estudo dos MCs tem sido pouco explorado na literatura e limitado aos mecanismos inflamatórios e de hipersensibilidade. Faz-se, portanto, necessário ampliar a descrição de sua morfologia, bem como da ação de seus principais mediadores químicos a fim de compreender melhor a sua complexidade funcional.

4.2.2 Histórico

É provável que o mastócito tenha sido observado pela primeira vez pelo patologista alemão von Recklinghausen, em 1863, *in vivo*, no mesentério de rãs⁴⁶. Tais células granulares

foram descritas alguns anos depois por Paul Ehrlich, na ocasião ainda estudante de Medicina, em 1878, com base em sua característica de metacromasia, a qual consiste basicamente em uma propriedade que permite obter uma coloração de cor diferente daquela do corante utilizado para o processamento histológico. Seus estudos foram capazes de comprovar a singularidade dos MCs entre os outros tipos de células presentes nos tecidos, sendo o biólogo o responsável pela nomenclatura a eles atribuída, *mast cell*, que se refere às células do tecido conjuntivo positivas para corantes da família anilina, que considerou super nutridas, surgindo, assim, o termo *mast*, do alemão para “alimentação”^{47,48}.

Anteriormente, o MC foi classificado como plasmócito em razão de sua similaridade morfológica, e associado ao processo inflamatório, com ação observada sobre os nervos e os vasos sanguíneos⁴⁹. A partir de sua descoberta, houve uma onda crescente de estudos que se propuseram a elucidar as funções e os mecanismos pelos quais o MC pode agir, sua origem e seus mediadores químicos. Com o passar dos anos, não somente o MC, mas também outros tipos de células sanguíneas e residentes na matriz extracelular, passaram a ser intensamente investigados com a crescente popularização das técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, assim como por meio de estudos imunohistoquímicos.

4.2.3 Origem

Os mastócitos, assim como outras células imunes, basófilos, eritrócitos, eosinófilos, monócitos e neutrófilos, são originados de células hematopoiéticas multipotentes com expressão de CD13, CD34 e CD117³⁹. Alguns precursores, com origem na medula óssea, foram identificados como os AA+(positivos para ácido araquidônico)/ BGD6+⁵⁰. Passam a se diferenciar sob influência do fator de células tronco (*stem cell factor* – SCF) e seu desenvolvimento, a partir de células progenitoras, ocorre por meio da ativação de receptor tirosina quinase tipo III CD117 (c-KIT), expresso na membrana dos mastócitos⁵¹, em resposta ao fator de células-tronco, que é produto de células epiteliais, endoteliais e fibroblastos.

As células progenitoras migram, de maneira específica, através da corrente sanguínea, até os tecidos periféricos, nos quais amadurecem e se diferenciam devido ao estímulo de citocinas, podendo alcançar um longo tempo de vida em razão da ação do fator de células-tronco. A sobrevivência e a apoptose dos mastócitos são reguladas por vias extrínsecas e intrínsecas, e as

proteínas Bcl-2 constituem seus principais reguladores⁵² (Gilfillan *et al.*, 2011). A constante exposição dos mastócitos aos fatores de crescimento citados, em conjunto com a expressão de receptores (c-KIT, FcεRI), permitem sua identificação morfológica antes mesmo da maturação de seus grânulos³⁹. Estudos apontam que a expressão do receptor SCF ou c-KIT é um fator de crescimento específico do mastócito, pois promove a diferenciação de células pluripotenciais e permite a liberação de mediadores⁵³.

Os mastócitos estão envolvidos em uma série de processos imunológicos e patológicos; entre eles estão: inflamação, remodelamento tecidual, angiogênese, fibroplasia, reações alérgicas e neoplasias. Por expressar o receptor FcεRI, que tem alta afinidade para a fração Fc do anticorpo IgE, ocorre reconhecimento de antígenos específicos e, assim, padrões bioquímicos são alterados. O mastócito passa a secretar seus grânulos, e esse processo é denominado de desgranulação, culminando na liberação de diversos mediadores biológicos num locus específico.

4.2.4 Métodos de Análise – Colorações Histoquímicas

À luz da microscopia óptica, o MC pôde ser identificado devido à sua propriedade de metacromasia, característica evidenciada pelo contato do corante azul de anilina básica com a heparina ácida. Sendo assim, os grânulos se coram de vermelho mesmo quando expostos ao corante azul, e, em razão dessa diferença cromática, observada por Ehrlich em 1876, foi possível sua distinção dos plasmócitos. Ademais, para realizar a coloração, é comumente empregado o corante azul de toluidina (AT), sendo essa técnica de coloração descrita originalmente por Luna (1968). O AT de caráter básico forma ligações eletrostáticas com os radicais ácidos dos tecidos. Um estudo de Holmgren & Wilander de 1937, com base nos achados prévios de Ehrlich & Jorpes, no mesmo ano, a respeito do anticoagulante heparina e a coloração metacromática, conseguiu correlacionar o número de mastócitos positivos para azul de toluidina em diversos tecidos com o seu conteúdo de heparina⁴⁶. No processamento histológico de rotina, no qual usualmente utiliza-se os corantes hematoxilina e eosina (HE), os MCs se apresentam intensamente basófilos, sendo muitas vezes difícil a identificação do seu núcleo e a sua distinção dos grânulos citoplasmáticos.

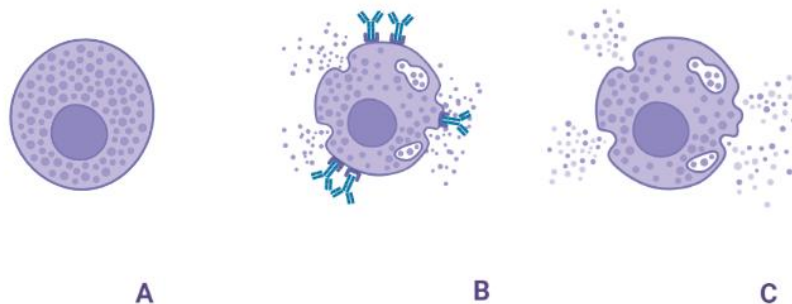
4.2.5 Ações Biológicas

4.2.5.1 Reparo Tecidual

Os mastócitos atuam em todas as fases do reparo tecidual, desde a fase inflamatória inicial. Essa célula é ativada para modular a resposta imune contra antígenos e patógenos, bem como sinalizar o recrutamento de outras células do sistema imune com papéis fundamentais nessa fase do reparo, a exemplo dos monócitos e neutrófilos. Seu envolvimento na fase proliferativa influencia diretamente na formação de novos vasos, deposição de colágeno e de matriz extracelular. Na fase de remodelamento, os mastócitos ainda atuam promovendo a biossíntese de colágeno no leito da cicatriz⁵⁴.

Os grânulos dos mastócitos contêm glicosaminoglicanos, enzimas e fatores quimiotáticos. Com a ativação do sistema complemento, esses mediadores são excitados (Figura 2). Tais mediadores químicos promovem vasodilatação, maior permeabilidade de proteínas plasmáticas nos tecidos, além do recrutamento e diferenciação de leucócitos e fibroblastos⁵⁵.

Figura 2 – Aspecto ilustrativo do mastócito intacto (A), mastócito sensibilizado pela imunoglobulina IgE liberando seus grânulos (B) e mastócito em evidente desgranulação (C).



Fonte: própria autora.

A interação do mastócito com o fibroblasto desempenha papel fundamental na fibroplasia. Alguns estudos têm demonstrado que esta associação pode contribuir para o aumento da biossíntese de fibras colágenas, num contexto patológico, a exemplo do que ocorre em cicatrizes hipertróficas e quelóides, caracterizados por intensa fibroplasia com consequente hialinização³.

Por sua característica armazenadora de grânulos, o mastócito é observado como uma célula estratégica, que libera tais grânulos para participar de processos refinados de sinalização. Dessa forma, o estudo das ações biológicas desempenhadas pelo mastócito pode tanto descrever sua atuação como propor inovações para regular suas respostas em diferentes contextos patológicos⁵⁶.

Os eventos celulares e moleculares que se desenrolam durante o reparo tecidual são didaticamente divididos em fases, ainda que elas possam ocorrer de forma concomitante. A fase inicial é marcada por hemostasia e inflamação aguda, deflagrando uma cascata de sinalização para promover a formação do coágulo, com o objetivo de restabelecer a hemostasia. Dessa forma, ocorre a agregação de plaquetas e formação de uma rede de fibrina e o estabelecimento de uma matriz provisória no leito da lesão¹⁵. No que diz respeito à inflamação, ocorre intensa transmigração de leucócitos polimorfonucleares mediada por moléculas de adesão como selectinas e seus receptores glicoprotéicos, assim como por integrinas e receptores da superfamília das imunoglobulinas. Tal diapedese é estimulada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular resultantes, principalmente, da ação da histamina e serotonina exocitadas pelos MCs.

A segunda fase é caracterizada pela modulação do infiltrado inflamatório, o qual é gradativamente substituído por células monomorfonucleares representadas pelos monócitos e linfócitos. Nesta fase, há formação de um tecido de granulação, constituído por fibroblastos, colágeno tipo III, fluido seroso residual além da neoangiogênese⁵⁷. Há uma intensa transmigração de monócitos, que se diferenciam em macrófagos M1 ou M2 no leito da lesão e atuam na liberação de fatores de crescimento, como o fator endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Essa etapa é denominada fase proliferativa, e esse tecido de granulação é capaz de sustentar a matriz extracelular provisória⁸.

Um estudo recente ressaltou que a ação do MC modula o microambiente tecidual, por meio da secreção de glicosaminoglicanos, que desempenham um papel iniciador na ativação do fibrinogênio. A presença de fibrina na matriz extracelular, organizada em rede, estimula a

crecente biossíntese de constituintes fibrilares como o colágeno e a elastina ⁵⁹. Dessa forma, tem início a fase final do reparo tecidual que consiste no remodelamento da matriz recém-formada, com conseqüente compactação e organização de fibras colágenas do tipo I as quais irão conferir maior força tênsil à área lesada. Ainda são escassas na literatura informações a respeito da participação dos mastócitos neste período do reparo, embora sua participação tenha sido associada á crescente fibroplasia.

O quadro a seguir sumariza as propriedades dos principais mediadores químicos dos MCs (Quadro 1). Alguns deles já se encontram pré-formados em grânulos secretórios e são caracterizados por seu baixo peso molecular, ao passo que outros são classificados como mediadores de nova geração, pois são sintetizados a partir dos lipídios de membrana. Nessa segunda categoria, enquadram-se os tromboxanos (TXs), as prostaglandinas (PGs), o fator de ativação plaquetária (PAF) bem como os leucotrienos (LTs) LTC₄ e LTB₄, que tem ação semelhante à da histamina, num intervalo de tempo mais prolongado. A produção de tais mediadores ocorre após o processo de desgranulação, com sua síntese ativada no intervalo de 8 a 12 horas. Adicionalmente, nesse grupo, pode-se citar ainda o fator estimulador de colônias granulócito/macrófago (GMCSF), além das interleucinas IL-3, IL4, IL5, IL6 e IL-33. As interleucinas citadas contribuem também para a maturação dos MCs, segundo evidências apresentadas na literatura^{60,61}.

Quadro 1 – Síntese de alguns dos principais mediadores químicos dos MCs.

Mediador químico	Classificação	Caracterização
Histamina	Pré-formada	Amina vasoativa que atua primariamente na fase inicial da inflamação. Após a lesão, macrófagos e neutrófilos são recrutados para o local da lesão, ao passo que o acúmulo de mastócitos, no leito da lesão, promove a liberação de histamina ⁵⁵ . A histamina contribui para o angioedema a partir de uma ação mediada por IgE, pois os MCs apresentam alta afinidade para IgE, em razão do grande número de receptores em sua superfície. A histamina promove aumento da permeabilidade vascular e aumento do fluxo sanguíneo, o que é fundamental para o recrutamento de diferentes grupos celulares ao leito da lesão. Essa é a única amina vasoativa contida nos grânulos dos MCs ⁶² .
Heparina	Pré-formada	Proteoglicano mais abundante nos MCs. Quando liberada, a heparina desempenha ação anticoagulante e, no contexto do reparo tecidual, atua na fase de remodelamento, pois ativa fatores de crescimento bem como estimula a ligação do colágeno com a fibronectina ⁶³ .
Triptase	Recém-sintetizada	Enzima apontada como principal produto secretado pelos mastócitos, e sua presença é constante na totalidade dos MCs humanos, de modo que a identificação da presença de triptase pode ser interpretada como um indicativo da ativação dos mastócitos. No contexto do reparo tecidual, atua como indutor de proliferação celular, estimulando a mitose de células epiteliais, bem como a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e a angiogênese ⁶⁴ .
Tromboxanos	Recém-sintetizados	São componentes lipídicos da família dos eicosanoides, conhecidos por sua ação vasoconstritora, e como agonista da agregação plaquetária. Também atuam como indutores da exposição dos sítios de ligação GB IIb/IIIa, que, por sua vez, interagem com o fibrinogênio e deflagram a ativação plaquetária ⁶⁵ .
Prostaglandinas	Recém-sintetizadas	Componentes lipídicos gerados principalmente no sítio inflamatório, as prostaglandinas são apontadas por induzir o processo de vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, a dor e o aumento da temperatura corporal ⁶⁶ .
Leucotrienos	Recém-sintetizados	Componentes lipídicos, assim como os tromboxanos, pertencentes à família dos eicosanoides. São formados a partir do metabolismo do ácido aracdônico e atuam como mediadores potentes na indução de citocinas ⁶⁶ .
Fatores de crescimento	Recém-sintetizados	Proteínas que promovem a proliferação e a diferenciação celular. Os MCs regulam a atuação das células T que, por sua vez, interagem com a IL-9 e secretam TGF- β ⁶⁷ . São considerados importantes fatores para a indução da angiogênese e, dessa forma, as evidências apontam para um papel refinado dos MCs na formação de novos vasos ⁶⁸ .
Interleucinas	Recém-sintetizadas	Proteínas capazes de atuar como sinalizadores para recrutamento e ação de células efectoras. Existem muitos tipos expressos pelos MCs, dentre eles, IL-3, IL4, IL5, IL6 e IL-33. A IL-33 se relaciona intimamente com os MCs, pois são conhecidas por promover a sua maturação ⁶⁹ . Em resposta à agregação por meio do Fc ϵ RI, IL-6 estimula a proliferação, maturação e atuação dos MCs ⁷⁰ .

Fonte: autoria própria.

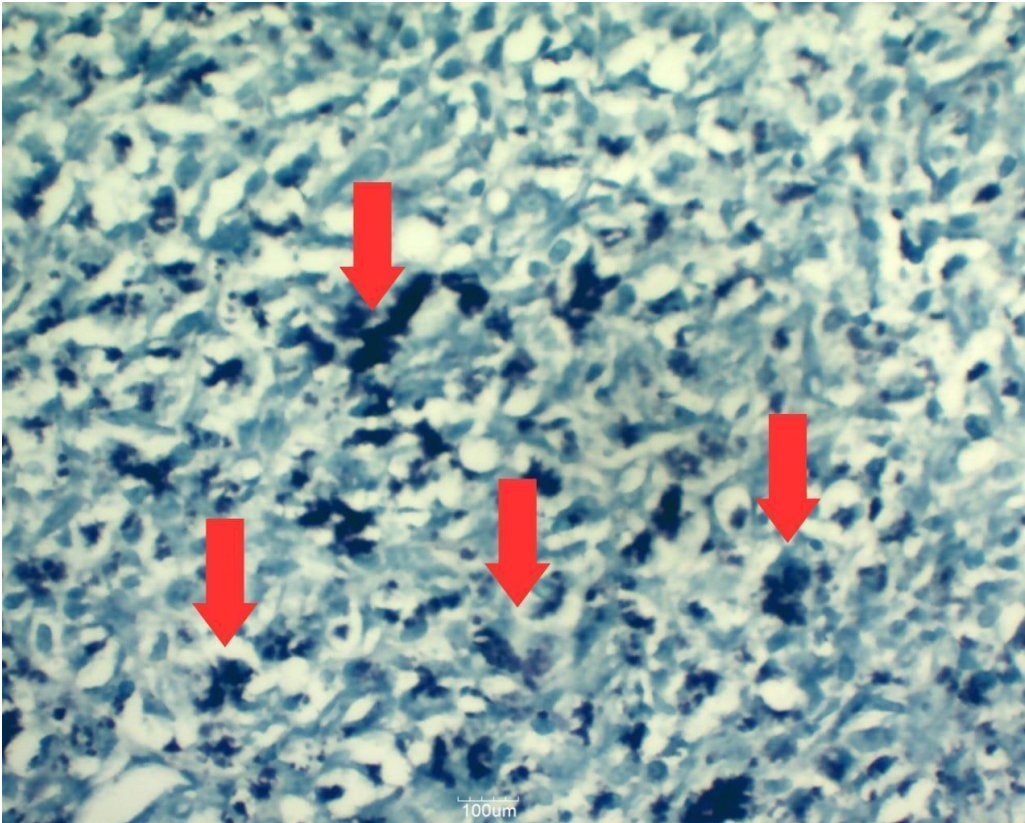
4.2.5.2 Alergia

Os MCs participam ativamente das reações alérgicas. Os chamados alérgenos estão presentes em grande quantidade no meio ambiente e são capazes de provocar respostas imunes adaptativas no organismo sensibilizado. Tais respostas são guiadas pelos linfócitos T CD4+, também conhecidos como linfócitos T auxiliares, do subtipo Th2, ou T helper, que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. O linfócito T estimula a produção de anticorpos IgE, específicos para cada alérgeno, por parte dos plasmócitos diferenciados a partir de linfócitos B. Os mastócitos associados às células T apresentam uma tendência de aparecer em maior número nas reações alérgicas e nas doenças parasitárias, em especial no combate a helmintos⁷¹.

A IgE possibilita a ligação do antígeno aos receptores de alta afinidade para IgE na superfície dos MCs e basófilos, entre eles o FcεRI. Quando ocorre o reconhecimento dos antígenos pelos anticorpos IgE, o receptor FcεRI desencadeia vias de sinalização intracelulares complexas, que resultam na liberação de mediadores químicos, tais como histamina, heparina, proteases, triptases e quinases^{72,51}.

As reações de hipersensibilidade são caracterizadas de acordo com a cascata de sinalização que é deflagrada e, a do tipo I, tem a participação destacada dos MCs. A hipersensibilidade tipo I é uma reação rápida e imediata ao antígeno, que produz a resposta imune. O alérgeno é ligado ao IgE, que, por sua vez, está ligado ao mastócito. Procede, então, a intensa desgranulação dos MCs (Figura 3). No geral, ocorre uma resposta imune inicial e, posteriormente, uma resposta de fase tardia³⁷. A participação dos MCs nos outros tipos de hipersensibilidade – a exemplo daquela do tipo II, que é mediada por anticorpos, a hipersensibilidade tipo III, mediada por imunocomplexos, e a hipersensibilidade tipo IV, mediada por células – não é tão direta e decisiva como na do tipo I⁷³.

Figura 3 – MCs (setas) com diferentes densidades citoplasmáticas que exibem desgranulação em reação alérgica na derme. Azul de Toluidina. 400X.



Fonte: autoria própria.

4.2.5.3 Neoplasias

Os MCs representam um infiltrado dominante nas neoplasias malignas de células B humanas, e o seu grau de infiltração acompanha a gravidade da doença. Os MCs representam uma fonte de diferentes citocinas, incluindo IL-1, IL-2, IL-6 e fator de células tronco (SCF) que podem induzir a proliferação de plasmócitos. Dessa forma, são comumente atraídos para o locus do tumor por SCF, secretado pelas células tumorais. Adicionalmente, o MC é uma das principais fontes secretoras de histamina no microambiente tumoral, sendo capaz de modular o crescimento tumoral mediado por H1 e H2⁴⁶. No contexto inflamatório das neoplasias, a histamina contribuirá para crescente vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Resta investigar mais detalhadamente de que forma os MCs poderiam contribuir de forma direta

para a metástase local e à distância, por meio desta recém adquirida maior permeabilidade dos vasos sanguíneos.

Segundo a literatura, a associação de mastócitos às células neoplásicas, no contexto da tumorigênese, aponta para uma ação indireta onde tal tipo celular, por promover angiogênese, contribui para o crescimento da neoplasia⁷⁴. A presença de mastócitos no estroma tumoral pode ocorrer a partir de mutações no proto oncogene c-KIT, que codifica o receptor da tirosina quinase e também pode estar relacionado à falha no mecanismo de apoptose, com aumento da expressão da proteína anti-apoptótica bcl-2⁷⁵.

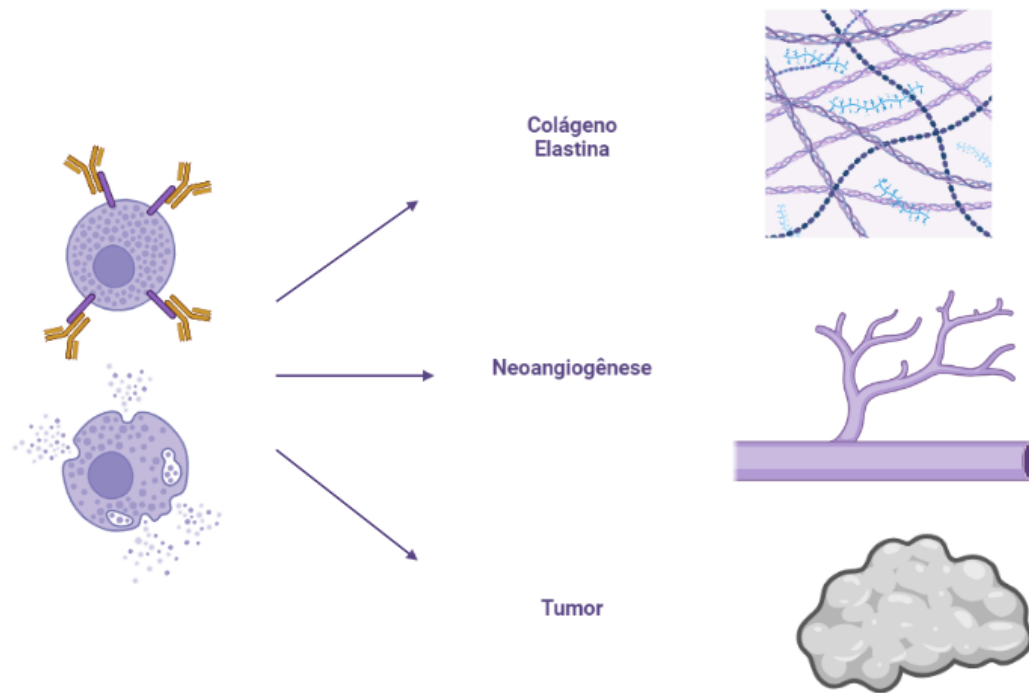
Dessa forma, os mastócitos são recrutados em resposta à inflamação crônica, e os fatores de crescimento angiogênicos contidos em seus grânulos, contribuem para a neovascularização bem como para a deposição de fibras, contribuindo para o crescimento do tumor. Os mastócitos têm sido amplamente investigados em diversos contextos patológicos em que sua atuação como indutor da formação de novos vasos retroalimentam as células neoplásicas. Varricchi⁷⁶. et al.(2019) destacaram, em sua revisão da literatura, um possível papel dual desempenhado pelos MCs na tumorigênese. O subtipo MC1 é apontado como anti-tumorigênico, e o MC2, apontado como pró-tumorigênico. Dentre os mecanismos anti-tumorigênicos estimulados por moléculas quimiotáticas oriundas do MC1, podem-se citar citotoxicidade e inibição do crescimento do tumor. A ação do MC2 é descrita de forma divergente, em que os estímulos das moléculas quimiotáticas promoveriam a angiogênese e a diferenciação de células epiteliais para mesenquimais.

Um estudo desenvolvido por Majorini⁷⁷ et al (2020) aponta para uma perspectiva na qual os mastócitos impactam no prognóstico do câncer de mama, por afetarem diretamente o fenótipo do tumor em consequência da ativação da cascata de sinalização por receptor de estrogênio. A característica do MC de promover a angiogênese é apontada como um importante indicativo da participação desse grupo celular na gênese desse tipo de tumor^{78,79}.

Tendo em vista a participação do MCs na formação de novos vasos, há possibilidade de modular essa ação biológica a partir de um tratamento adjuvante específico e inibir seletivamente a angiogênese, o remodelamento tecidual e o crescimento de tumores^{46,80}.

A Figura 4 ilustra esquematicamente a participação dos MCs nos processos biológicos já descritos.

Figura 4 – Aspecto ilustrativo do mastócito sensibilizado pela imunoglobulina, IgE, em sequência liberando seus grânulos



Fonte: autoria própria.

Em virtude da pluralidade de atuações dos MCs, em diferentes contextos biológicos, nota-se a importância do desenvolvimento de estudos que ampliem o conhecimento dos mecanismos atualmente descritos. Acredita-se que tais células podem ainda participar de outros eventos celulares e moleculares que não foram totalmente compreendidos e registrados na literatura. Embora, sua participação nas reações de hipersensibilidade e na inflamação venha sendo cada vez mais estudada, no contexto tumoral ainda necessita ser elucidada. Em especial, urge conhecer melhor as subpopulações que residem na matriz extracelular, ou aquelas mobilizadas a partir de células tronco adultas residentes no tecido de origem e oriundas da medula óssea. Em razão da sua complexidade morfofuncional, a realização de estudos que contemplem os MCs como alvos terapêuticos em potencial, através do desenvolvimento de fármacos e/ou terapias adjuvantes capazes de modular a função dessas células, representa uma abordagem promissora. A maturação, o fenótipo e a função dos MCs se constituem uma consequência direta de sua inter-relação como o microambiente e representam uma influência decisiva sobre

a sua habilidade de reconhecer e responder especificamente aos mais variados estímulos através de uma complexa biossíntese de mediadores químicos.

4.3 A OZONIOTERAPIA E O REPARO TECIDUAL

O ozônio possui geometria molecular triatômica e é formado por três moléculas de oxigênio (O_3). Ainda que se apresente como uma molécula simples, cabe destacar sua capacidade de polarização conferida por sua geometria angular e a disposição de um par de elétrons não compartilhados em um de seus átomos. Devido à sua alta instabilidade molecular, dissociada em uma molécula de O_2 e um átomo de O^{\cdot} , pode reagir com outros átomos em função da sua capacidade altamente oxidativa. O O_3 retira elétrons de outras moléculas por oxidação e adiciona um elétron não pareado⁸¹.

Historicamente, o ozônio é descrito desde o século XIX e a sua utilização para fins medicinais foi introduzida no contexto da primeira guerra mundial, pelo médico George Stoker, com finalidade de tratar ferimentos em soldados. Inicialmente, o uso do ozônio objetivava tratar infecções anaeróbicas causadas por *Clostridium sp*, que são sensíveis aos efeitos do O_3 ⁸². Dessa forma, em 1916, foi publicado, no periódico *The Lancet*, um dos primeiros estudos sobre a aplicabilidade terapêutica do ozônio, e suas propriedades microbicidas e vasodilatadoras foram relatadas⁸³.

Um estudo avaliou o efeito do O_3 no perfil inflamatório e proteômico de macrófagos e células epiteliais das vias aéreas. Células epiteliais brônquicas humanas (HBEpC) e macrófagos humanos (diferenciados a partir da linhagem celular monocítica) foram expostas ao O_3 na concentração de $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (120 ppb), correspondente ao Limiar de alerta da União Europeia. Variáveis como viabilidade celular, produção de ROS e efeitos pró-inflamatórios à liberação de citocinas (IL-8 e TNF- α) foram avaliadas. Os resultados indicaram que a exposição ao O_3 aumentou a produção de ROS em ambos os tipos de células e também aumentou a liberação de citocinas em macrófagos. O O_3 estimulou a biossíntese de IL-8 e TNF- α em HBEpC quando as células foram pré-tratadas com lipopolissacarídeo, usado para mimetizar uma condição inflamatória pré-existente.

Seus efeitos terapêuticos também têm sido investigados em patologias específicas. No contexto do tratamento de neoplasias, uma hipótese para o emprego do ozônio permitiria uma redução na hipoxemia tumoral, podendo promover maior eficácia da radioterapia ou da

quimioterapia, ou ainda inibir seletivamente o crescimento de tumores⁷². Ainda nesse sentido, uma revisão sistemática conduzida por Baeza-Noci⁸⁵ (2022) apontou o ozônio como uma potencial quimioterapia nova. Tal revisão abarcou estudos *in vitro* com resultados para o possível efeito citotóxico. Os estudos *in vivo* apontaram para uma melhora na resposta imune e na radiosensibilidade, e um ensaio clínico avaliou a sobrevida de pacientes. Dessa forma, concluiu-se que os efeitos pré-clínicos foram positivos, mas a extrapolação desses resultados para a prática clínica ainda não são considerados completamente elucidativos.

Nos dias atuais, a utilização do ozônio com propósito terapêutico tem sido apontada como aceleradora do reparo tecidual devido à sua interação com diferentes componentes celulares, como leucócitos, eritrócitos, células endoteliais e plaquetas. A aplicação do ozônio no local da lesão pode favorecer os processos metabólicos envolvidos na cicatrização por promover síntese de matriz extracelular, aumentar o quantitativo de leucócitos presentes no local do ferimento, bem como estimular a liberação de fatores de crescimento com vistas à biossíntese da matriz extracelular e restabelecimento funcional do tecido⁸⁶.

As propriedades do ozônio são amplamente conhecidas na literatura. Entre seus efeitos no tecido, têm sido relatados melhora na oxigenação, degradação de produtos tóxicos celulares, além de potenciais bactericida, antifúngico e antiviral. São várias as formas de apresentação e vias de administração do ozônio. Pode ser empregado como gás, podendo ser insuflado por via retal, auricular, vaginal, bem como associado a veículos para aplicação tópica, como água, óleo e nanopartículas ozonizadas¹⁴. Para administração do ozônio por injeção subcutânea em tecidos, é recomendável que sua concentração não ultrapasse 20 µg/mL e um volume de gás de 20 mL, a fim de não causar dor e evitar o risco de embolia⁸⁶.

O óleo ozonizado foi elaborado por médicos alemães em 1905, com o objetivo de formular produtos derivados do ozônio, com melhor estabilidade e melhores condições de armazenamento que o gás⁸⁷. Para produção do óleo ozonizado, o gás é borbulhado, ininterruptamente durante o período de dois dias, em óleo vegetal, obtendo uma concentração de 160 mg de ozônio a cada grama de óleo. O ozônio interage com as ligações duplas de ácidos graxos que compõem os óleos vegetais, produzindo ozonídeos (anéis 1,2,4 -trioxolanos) e espécies epoxídicas, tais como: peróxidos poliméricos, peróxidos de hidrogênio, assim como outros peróxidos orgânicos⁸⁸.

Do ponto de vista terapêutico, as composições ozonizadas têm capacidade de fornecer O₂ ativo no interior da lesão, sem causar uma irritação primária nesse tecido, sendo capaz de estimular os sistemas antioxidantes⁸². Seu poder oxidativo é considerado sua principal

característica, além de estimular a produção de antioxidantes endógenos. Como descreve Galie⁸⁹, *et al* (2019), o Nrf2, Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide, representa um ponto-chave para a eficácia dos tratamentos com ozônio. A translocação nuclear desse fator é aumentada através da ozonização leve, o que induz a transcrição dependente de Keap1 mediada por Nrf2 de genes acionados por elementos responsivos antioxidantes, que codificam diversas proteínas envolvidas em muitas funções metabólicas vitais, sendo uma dessas funções a resposta ao estresse oxidativo. O Nrf2 é capaz de prevenir estresse oxidativo por meio da transcrição de enzimas antioxidantes, como, por exemplo, as subunidades catalíticas e moduladoras de Glutamato Cisteína Ligase, as Glutathione Peroxidases (GPX2 e GPX4), entre outras. Devido à característica química de instabilidade do gás ozônio, que permite uma reação instantânea a nível molecular e induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), é gerado um estresse oxidativo transitório e moderado.⁹¹

A concentração do ozônio administrado deve ser compatível com a capacidade antioxidante do sangue e, assim, ocorre a formação do peróxido de hidrogênio e produtos de oxigenação lipídica (LOP's) capazes de estimular a produção endógena de enzimas antioxidantes, entre elas, a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT)⁹⁰. O ozônio estimula o fluxo de oxigênio através da membrana e essa ação eleva os níveis de oxigênio dentro da célula, tornando a cadeia respiratória mitocondrial mais eficiente.

A ozonioterapia também tem demonstrado efeitos na ativação do sistema imune. O ozônio interage com ácidos graxos poli-insaturados e outros antioxidantes, e o peróxido de hidrogênio se difunde facilmente nas células de defesa. Desempenha também o papel de regulador da sinalização para que um grande número de respostas imunes aconteça⁹¹.

Existe uma crescente discussão nas áreas de saúde quanto ao uso terapêutico do ozônio, em especial, no que tange à administração efetiva e segura. Em razão do aumento de métodos de aplicação, os quais muitas vezes são instituídos por profissionais não capacitados, urge a necessidade de estudos com maior rigor científico que comprovem a eficácia desse tipo de terapia⁸⁸. O Sistema Único de Saúde do Brasil, em sua Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)⁹³, implementada em 2006, incluiu, em março de 2018, a ozonioterapia. Em agosto de 2023, autorizou o seu uso em todo o território nacional como uma modalidade terapêutica para profissionais da saúde devidamente registrados em seus respectivos conselhos de classe.

5. METODOLOGIA

5.1 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental *in vivo*. Este estudo foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA). Foi registrado com o número de protocolo 67/2019. O número do parecer de aprovação pelo CEUA foi CIAEP: 01.0039.2013. (ANEXO 2)

5.2 AMOSTRA DO ESTUDO

A amostra contemplou 30 ratos machos *Wistar* com peso entre 200-400 gramas (g) provenientes do biotério da Faculdade Adventista da Bahia. Os animais foram alocados aleatoriamente em 3 grupos experimentais de 10 ratos cada, os quais foram sacrificados no 5º e 10º dias após o início dos testes. Em cada um desses períodos, 5 ratos de cada grupo experimental foram sacrificados. O Grupo 1 correspondeu ao Grupo Controle (GC) e foi tratado com solução salina a 9%, sem utilização de ozônio; o Grupo 2, chamado de Grupo gás Ozônio (GGO), recebeu terapia com ozônio gasoso insuflado na borda da lesão; e o Grupo 3, Óleo Ozonizado (GOO), foi tratado com óleo na superfície da lesão.

Durante o experimento, os animais ficaram alojados em condições sanitárias de biotério convencional. Foram acondicionados em gaiolas individuais, etiquetadas, com chão coberto por maravalha, mantidos em condições padrão de temperatura (22-25°C), umidade relativa (50-52%), com ciclos de luz-escuro por 12 horas, e expostos à luminosidade artificial doze horas por dia. A alimentação dos ratos foi feita com ração balanceada Nuvilah® (Suprilab) e água *ad libitum*.

5.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E OZONIOTERAPIA

Seguindo os protocolos preconizados para experimentos com animais (Damy *et al.*, 2010), esses foram submetidos à pesagem e anestesiados com cloridrato de quetamina 10%

(Dopalen®, São Paulo, Brasil) 75 mg/ml e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan, São Paulo, Brasil) 5 mg/ml, com a dosagem de 2mg/kg e 3mg/kg, respectivamente. Em seguida, efetuou-se a tricotomia dorsal.

Foi realizada uma incisão circular na região dorsal com o auxílio de um bisturi circular metálico, *punch* (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha), com 6mm de diâmetro, para a obtenção de uma ferida uniforme e padronizada, a qual foi executada por um único operador devidamente calibrado, de acordo com o modelo descrito por Medrado *et al.*, (2003).

O ozônio foi produzido pelo gerador Philozon® (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil) na concentração de 13µg/ml de ozônio, a partir de oxigênio medicinal, com fluxo constante de 1L/min. A mistura com oxigênio foi capturada em uma seringa de 4ml e, através de uma agulha de insulina, o gás foi insuflado com volume de 1ml, de forma uniforme, em 4 pontos correspondentes aos vértices diametraais, na borda da lesão. Esse procedimento foi repetido por três dias consecutivos, após a cirurgia.

Foi administrado óleo de girassol ozonizado a 100% (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil). Aplicou-se uma gota, com conta-gotas padronizado com volume de 1 ml, na superfície da lesão por 3 dias consecutivos nos mesmos moldes dos grupos anteriores.

Os animais foram submetidos às duas modalidades de ozonioterapia descritas nos dias 1, 2 e 3 do estudo. Cada grupo com 10 animais teve metade dos espécimes sacrificados no 5º dia e a outra metade no 10º dia.

5.4 MORTE DOS ANIMAIS

Após sedação profunda com a solução anestésica já descrita, os animais foram alocados em caixas nas quais gás carbônico foi liberado em uma concentração de 5 litros por minuto.

5.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a confirmação de morte, foi removida uma porção de tecido do dorso dos ratos, compreendendo a ferida cirúrgica. O material foi fixado por um período mínimo de 18 horas, em solução de formol 10%, tamponado. Em seguida, esse tecido foi processado para a coloração com azul de toluidina e HE, para estudo dos MCs, em secções de 4 µm de espessura.

5.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

A captura das imagens dos cortes teciduais submetidos às colorações descritas foi realizada através do software Motic Images Advanced 3.0® (Motic China Group CO. LTD) do Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Foi estabelecida uma área padrão para análise de todos os casos (100 μm^2), que compreendem a região central do ferimento, tendo como limites laterais o tecido normal adjacente. Cinco imagens padrão correspondentes a cada caso foram capturadas com a dimensão pré-estabelecida e utilizadas tanto para a análise quantitativa dos mastócitos quanto para análise semi quantitativa do infiltrado inflamatório monomorfonuclear. Cada área foi capturada no aumento de 400x e salva em formato JPEG. Todas as análises foram realizadas e documentadas por um único examinador calibrado e com vasta experiência.

Foi realizada contagem de mastócitos intactos e desgranulados em secções corados com Azul de Toluidina em cada micrografia, nos mesmos moldes de Correia et al., (2013).

O grau de inflamação no tecido foi analisado de acordo com o estudo de Alvarenga et al., (2020). Foi realizado um estudo semiquantitativo das secções, que incluiu a análise das variáveis infiltrado inflamatório monomorfonuclear. Foram adotados os seguintes critérios no tocante à variável infiltrado inflamatório: grau 1 para inflamação aguda; grau 2 para predominância de inflamação aguda difusa; 3 para predominância de processo inflamatório crônico; e 4 para indicar resolução completa e cicatrização. Com relação à intensidade da inflamação, considerou-se 1 para grau leve, 2 para moderada, 3 para intensa e 4 muito intensa.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi elaborada uma planilha em Excel (versão para windows 10) para análise descritiva com valores correspondentes a medianas e quartis.

Para análise dos dados, foram utilizados os testes ANOVA, T de Student e o teste exato de fischer, não-paramétricos, com a finalidade de identificar as características gerais e específicas da amostra estudada.

Para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos de interesse, foi utilizado o teste t. O nível de significância estabelecido para este trabalho é de 5%.

6. RESULTADOS

No GC foi observado intenso infiltrado inflamatório monomorfonuclear na área da lesão, o qual aumentou até o 10º dia do período pós-operatório ($p=0,008$). Os grupos tratados GGO e GOO apresentaram escores semelhantes no 5º dia, os quais refletiram moderado infiltrado monomorfonuclear na derme ($p>0,05$). (Figura 5 A,C e E). Contudo, no 10º dia o grupo GOO apresentou intensidade de infiltrado inflamatório monomorfonuclear semelhante ao controle.

No 10º dia, GGO e GOO apresentaram infiltrado leve de células monomorfonucleares em relação ao GC, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa nesse período, embora a análise intragrupos tenha revelado diferença significativa da transição de infiltrado monomorfonuclear moderado para leve no GOO ($p=0,016$); (Tabela 1).(Figura 5 B,D e F).

No GC, houve aumento do número total de mastócitos no 5º. dia quando comparado ao 10º dia, em especial, representado pelos mastócitos desgranulados, ao passo que o número de intactos tendeu a diminuir. Contudo, tais diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). Aspectos semelhantes foram observados no grupo submetido à terapia com gás ozônio, embora neste grupo experimental tenha sido constatada diferença estatisticamente significativa no aumento do número de mastócitos desgranulados, do 5º. para o 10º. dia ($p=0,04$). No grupo que recebeu a terapia com óleo ozonizado, o quantitativo de mastócitos totais, intactos e desgranulados exibiu aumento, mas sem significância estatística ($p>0,05$); (Tabela 2).

No 5º dia, observou-se que os grupos experimentais submetidos à terapia com gás ozônio e óleo ozonizado apresentaram um maior número total de mastócitos em relação ao grupo Controle, entretanto essa diferença não foi significativa ($p> 0,05$). Houve diferença estatisticamente significativa apenas no tocante ao número de mastócitos desgranulados, com evidente aumento dessas células tanto entre os grupos Controle e gás ozônio quanto Controle e óleo ozonizado ($p=0,0003$ e $p=0,004$, respectivamente); (Tabela 3); (Figura 6 A, C e E).

No período pós-operatório correspondente ao 10º dia, o número total de mastócitos apresentou perfil semelhante ao do 5º dia de análise, pois ambos os grupos tratados exibiram maior contingente de MCs em relação ao Controle ($p>0,05$). Os números de MCs intactos e

desgranulados entre os diferentes grupos experimentais ($p < 0,05$); (Tabela 3); (Figura 6 B, D e F).

Tabela 1: Registro do infiltrado inflamatório monomorfonuclear entre os grupos experimentais com respectivas medianas e intervalos interquartis.

Variável	Resultado	GC		GGO		GOO	
		5° dia Med (q1-q3)	10° dia Med (q1-q3)	5° dia Med (q1-q3)	10° dia Med (q1-q3)	5° dia Med (q1-q3)	10° dia Med (q1-q3)
Infiltrado Inflamatório		3(2,5-3)	4(4-4)	3(3-3)	3(3-3,5)	3(3-3)	4(3,5-4)
	p-valor	0,008		0,690		0,063	

Tabela 2: Registro do quantitativo de mastócitos, intactos e desgranulados nos diferentes grupos experimentais com respectivas medianas e intervalos interquartis.

		Quantitativo	Soma	Mediana (quartis)	p valor
GC 5° dia	MCs Intactos	68	90	12 (10-14)	
	MCs Desgranulados	22		4 (4-4)	
GGO 5° dia	MCs Intactos	87	130	13 (12-14)	0,01*
	MCs Desgranulados	43		8 (8-9)	
GOO 5° dia	MCs Intactos	63	119	15(9-15)	0,02*
	MCs Desgranulados	56		10 (10-14)	
GC 10° dia	MCs Intactos	60	105	13 (12-14)	
	MCs Desgranulados	45		8 (8-9)	
GGO 10° dia	MCs Intactos	84	142	14 (24-17)	0,09
	MCs Desgranulados	58		10 (10-14)	
GOO 10° dia	MCs Intactos	77	145	20 (10-22)	0,37
	MCs Desgranulados	68		14 (12-15)	

* p<0,05

Tabela 3: Registro Intergrupos e Intragrupos nos 5° e 10° dias do período pós operatório.

Grupos	Intactos p valor	Desgranulados p valor
Grupo Controle 5° X Ozônio Gás 5°	0,28	0,0003*
Grupo Controle 5° X Ozônio Óleo 5°	0,39	0,004*
Grupo Controle 5° X Grupo Controle 10°	0,25	0,006*
Grupo Controle 10° X Ozônio Gás 10°	0,10	0,21
Grupo Controle 10° X Ozônio Óleo 10°	0,23	0,07
Ozônio Gás 5° X Ozônio Gás 10°	0,46	0,04*
Ozônio Óleo 5° X Ozônio Óleo 10°	0,27	0,14

* p<0.05.

Figura 5: Análise histomorfométrica dos grupos experimentais. Registro de fotomicrografias de secções histológicas de pele de ratos Wistar representativa do ferimento cutâneo padronizado, nos períodos de 5º e 10º dias. São evidenciados o infiltrado inflamatório monomorfonuclear de todos os grupos. Percebe-se que no 5º dia, os grupos GC (A), GGO (C) e GOO (E) evidenciaram características semelhantes e apresentaram aspectos de inflamação crônica com intensidades moderada e intensa. No período de 10º dias, os grupos GC (B), GGO (D) e GOO (F) evidenciaram características correspondentes com as etapas mais tardias do reparo, e inflamação leve. Microscopia de luz, Hematoxilina-eosina, 100X (ICS-UFBA).

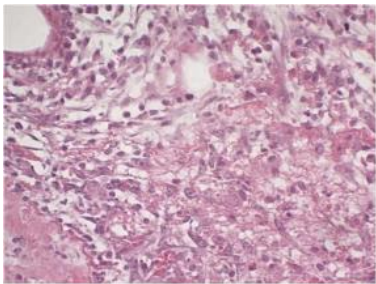
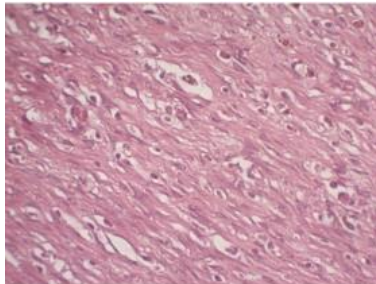
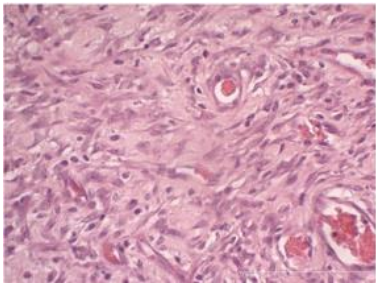
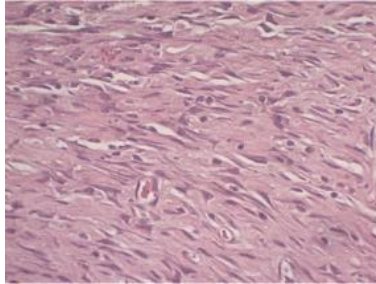
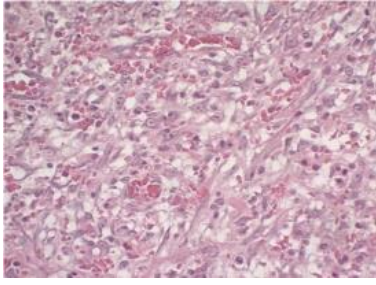
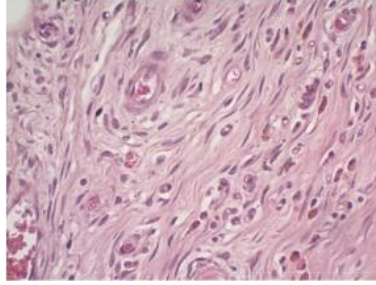
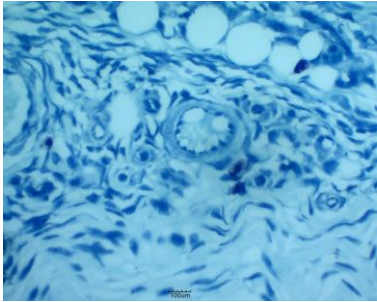
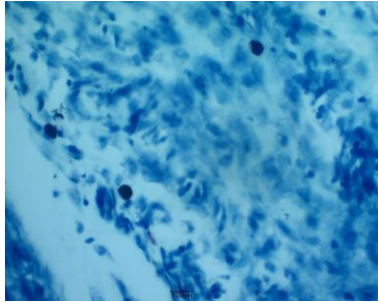
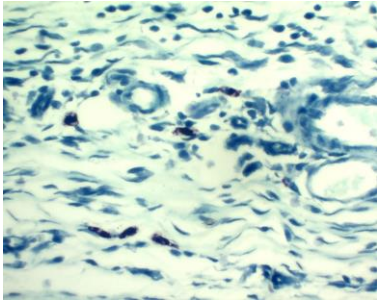
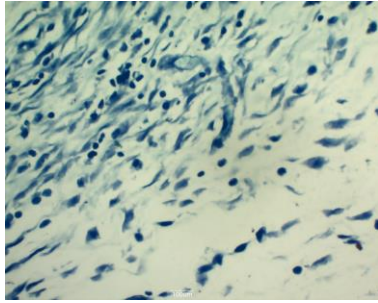
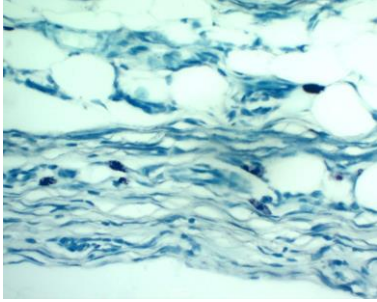
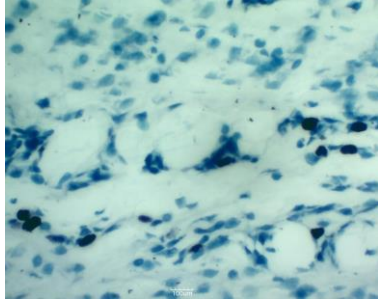
	5º dias	10º dias
GC	 A	 B
GGO	 C	 D
GOO	 E	 F

Figura 6: Análise histomorfométrica dos grupos experimentais. Registro de fotomicrografias de secções histológicas de pele de ratos Wistar representativa do ferimento cutâneo padronizado, nos períodos de 5º e 10º dias. São evidenciados numerosos mastócitos na derme em todos os grupos, em especial os tratados. percebe-se que no 5º dia, os grupos GC (A), GGO (C) e GOO (E) evidenciaram maior quantitativo de mastócitos intactos. No período de 10º dias, os grupos GC (B), GGO (D) e GOO (F). Microscopia óptica, Azul de Toluidina, 400X (ICS-UFBA)

	5º dias	10º dias
GC	<p>A</p> 	<p>B</p> 
GGO	<p>C</p> 	<p>D</p> 
GOO	<p>E</p> 	<p>F</p> 

7. DISCUSSÃO

O presente estudo experimental objetivou analisar o reparo tecidual sob a influência da ozonioterapia a fim de avaliar os efeitos do ozônio na cicatrização, administrado através de duas diferentes vias: óleo ozonizado e insuflação local do gás ozônio. Em especial, por meio de estudo histomorfométrico, foi possível identificar o contingente de mastócitos intactos e desgranulados, assim como o infiltrado inflamatório monomorfonuclear. Tal estudo histomorfométrico foi realizado em períodos correspondentes à fase inflamatória crônica que corresponderam aos 5º e 10º dias do período pós-operatório. Essa fase do reparo tecidual já foi objeto de análise de outros estudos, a exemplo do desenvolvido por Rodrigues⁹⁴ e colaboradores (2019), e apresenta como principal vantagem permitir a observação da população de células que participam da fase proliferativa do reparo, a qual se torna mais evidente com a formação de uma matriz extracelular provisória representada pelo tecido de granulação.

De acordo com Aarabi⁹⁵ e colaboradores (2007), durante o reparo tecidual há uma transição gradual do infiltrado de células polimorfonucleares para monomorfonucleares, em especial na fase correspondente à inflamação crônica. No presente estudo, observou-se tal tendência. Contudo, apenas o GGO apresentou menor escore de células monomorfonucleares em relação aos demais grupos experimentais no 10º dia da cicatrização, embora esse dado não tenha sido estatisticamente significativo ($p=0,69$).

Diversos estudos experimentais *in vivo* apresentaram resultados significativos quanto ao potencial biomodulador do ozônio no reparo, como o desenvolvido por Pires¹⁴ e colaboradores (2021). Esses autores constataram diferenças estatisticamente significativas quanto ao estágio inflamatório em dois períodos distintos. No sétimo dia do pós-operatório, foi observado um reparo mais avançado pois houve uma resolução mais significativa da inflamação crônica em relação ao grupo controle. No período de 15 dias, a análise morfológica demonstrou ausência de inflamação para todos os grupos experimentais. Os autores concluíram que a ozonioterapia com aplicação local do gás ozônio foi eficaz em amenizar o grau do infiltrado inflamatório e acelerar o reparo da ferida, com maior contração desta. Tais resultados ratificam os achados da presente pesquisa e sugerem um potencial efeito anti-inflamatório do ozônio em fases mais

tardias do reparo. Contudo, faz-se necessário investigar mais detalhadamente a ação do ozônio na fase inflamatória inicial, em especial ao se considerar o seu papel indutor de processos de oxi-redução⁹⁶.

Até o presente momento, alguns estudos publicados na literatura científica avaliaram a participação de mastócitos no reparo tecidual, mas com maior ênfase destinada à fase inflamatória inicial. As ações dos MCs dependem de contextos, como o microambiente no qual está inserido e a severidade da lesão. Tais células conduzem respostas que podem variar entre pró e anti-inflamatórias. Beghdadi⁹⁷ e colaboradores (2011) sugerem que os MCs desenvolveram sensores celulares que permitem identificar o microambiente com o propósito de deflagrar uma resposta adequada, a fim de favorecer a inflamação ou até mesmo limitar esse processo. Dessa forma, o presente estudo apresenta resultados inéditos, pois não só compreendeu uma análise da fase proliferativa do reparo como também permitiu verificar a influência da ozonioterapia nesse processo, em especial sobre os mastócitos.

Tem sido demonstrado na literatura que a ativação de MCs teciduais é capaz de induzir secreção de uma variedade de moléculas biologicamente ativas que implicam atividades quimiotáticas. Esses mediadores, a exemplo da histamina e serotonina, modulam o microambiente por produzir uma reação que promove a permeabilidade vascular. Na fase inicial da inflamação, tal aumento da permeabilidade vascular viabiliza a infiltração de células polimorfonucleares onde os neutrófilos assumem um papel de destaque. Já na fase mais tardia, os MCs também contribuem para a infiltração tecidual de células monomorfonucleares por meio da estimulação proveniente de fatores quimiotáticos para os leucócitos^{98,99}. Assim, durante as primeiras 6 a 24 horas, à proporção que a transmigração de monócitos aumenta gradativamente, os macrófagos se tornam mais numerosos no leito da ferida e ocorre um crescente processo de cronificação da inflamação, a partir de 24 horas em diante. Quanto aos neutrófilos, após sua diapedese, diminuem em número por autólise, necroptose e apoptose. Desses componentes do infiltrado, o mais longevo é o macrófago, o qual passa a predominar no microambiente local e orquestrar reações inflamatórias mais prolongadas¹⁰⁰.

No tocante ao contingente de MCs no presente estudo, constatou-se um crescente aumento dessa população celular, do 5º para o 10º dia, em todos os grupos experimentais. Tal achado ratifica a hipótese de que os MCs participam efetivamente em todas as fases do reparo tecidual¹⁰¹. Contudo, na literatura, há uma ênfase maior direcionada para estudos dos MCs na fase inflamatória aguda, a qual não foi objeto de análise na presente investigação. Um estudo *in vivo* conduzido por Shiota¹⁰² e colaboradores (2009) propôs a observação dos MCs durante

o processo de cicatrização de feridas resultantes de dano térmico, comparando grupos em que havia presença dessas células e outro com deficiência delas. Os resultados encontrados demonstraram que o reparo foi prejudicado nas linhagens de ratos que não expressavam os MCs, principalmente nos tempos de 14° e 21° dias, que correspondem à fase de remodelamento. Dessa forma, os autores sugeriram que pode ter ocorrido uma maior participação dos MCs nas fases tardias do reparo. Nesse mesmo sentido, um estudo realizado por Atiakshin¹⁰³ e colaboradores (2020) enfatizou a relação entre os MCs e o fibrinogênio, indicando que através da secreção de glicosaminoglicanos, substância que desempenha papel fundamental no estímulo inicial do fibrinogênio presente no tecido, os MCs podem também atuar como moduladores do microambiente tecidual e estimular a formação de uma rede de fibrina que, por consequência, poderia determinar maior estímulo à biossíntese do colágeno.

A desgranulação mais tardia dos MCs na fase proliferativa parece estar relacionada com a biossíntese de colágeno e de outros constituintes estruturais da MEC, etapa fundamental para o tecido adquirir a força tênsil necessária¹⁰⁴. Embora a análise das fibras colágenas não tenha integrado o escopo desse estudo, o maior número de MCs, em especial desgranulados, nos grupos tratados, sugere que a ativação dessa célula poderia contribuir para a evolução do reparo tecidual, apresentando um perfil funcional mais voltado para o estímulo de fenômenos proliferativos. Neste estudo, a análise realizada ao 10° dia permitiu avaliar que a presença de MCs intactos e desgranulados ao final da fase proliferativa do reparo foi maior nos grupos submetidos à ozonioterapia, em especial no grupo experimental que recebeu a insuflação local do gás. De fato, os resultados do presente estudo sugerem que a forma de aplicação do ozônio pode também ser uma variável determinante para a observação de um efeito pró ou anti-inflamatório mais significativo, a depender da fase do reparo em questão.

O potencial terapêutico do ozônio como agente pró e anti-inflamatório tem sido discutido na literatura. Há evidências de que o seu principal mecanismo de ação consiste na exacerbação inicial da resposta inflamatória de forma controlada no tecido, mediante o equilíbrio das reações de oxirredução¹⁰⁵. Ainda de acordo com Liu¹⁰⁶ (2018), o ozônio é capaz de controlar o estresse oxidativo por meio da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB). Sendo assim, a expressão precoce de NF-κB ativaria a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-1 beta, que induzem a fase inicial da inflamação. Por outro lado, a diminuição da expressão do gene que codifica tal fator de transcrição resulta na produção de enzimas antioxidantes, entre elas, a glutatona peroxidase e a catalase.

Entre as ações do ozônio no contexto do reparo, por sua característica de potente oxidante, tem sido documentado que também é capaz de eliminar microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus e fungos, presentes no leito da lesão¹⁰⁶. A ação antimicrobiana do ozônio *in vitro* foi demonstrada em resultados de um estudo realizado por Silva¹⁰⁷ e colaboradores (2021) no qual foram encontradas justificativas para o emprego tanto do gás ozônio quanto do óleo ozonizado como microbicida capaz de eliminar microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Nesse estudo para fim de profilaxia, os autores relataram resultados superiores para o gás ozônio em relação ao óleo ozonizado. Ademais, pode se afirmar, com base na literatura, como vantajoso o custo-benefício do ozônio para ação antimicrobiana em detrimento a outros agentes de desinfecção e antisepsia. Além disso, tem sido relatado que a ozonioterapia disponibiliza O₂ no tecido, por sua grande instabilidade molecular. Dessa forma, por meio de uma melhor oxigenação tecidual, a atividade funcional dos fibroblastos pode ser aumentada e, assim, contribuir para a aceleração das fases subsequentes do reparo¹⁰⁸. Diante do exposto, pode se esperar uma intensificação da inflamação no tecido, seguida por uma rápida resolução desse evento.

A fim de elucidar os possíveis mecanismos moleculares e celulares que expliquem a ação terapêutica do ozônio, algumas hipóteses têm sido discutidas na literatura. Estudos que abordaram a ozonioterapia apontam para evidências de que a liberação do óxido nítrico e das aminas vasoativas dos MCs, induzidas pelo ozônio, podem promover o desencadeamento de reações vasodilatadoras e, por consequência, aumento da perfusão de sangue e aceleração do reparo no tecido¹⁰⁹. Ademais, o ozônio pode induzir um acréscimo na carboxilação oxidativa do piruvato, assim como adicionar a produção de ATP no ciclo de Krebs e reduzir espécies oxidantes, como citocromo C. Também aumenta a produção de enzimas como a catalase, a peroxidase e a glutatona, que atuam como protetoras para células saudáveis, por sua ação eliminadora de radicais livres⁹⁸. Outro possível mecanismo está ligado ao estímulo à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Tais moléculas apresentam um elétron não pareado em sua orbital externa e se tornam radicais reativos. Essas moléculas podem ser originadas da fosforilação oxidativa mitocondrial, a partir do aumento da síntese de ATP¹¹⁰.

Em uma revisão sistemática realizada por Dunnill¹¹¹ e colaboradores (2017), são descritos os papéis desempenhados pelos EROs nas diferentes fases do reparo tecidual. Tais mediadores recrutam células imunes e estimulam a formação de novos vasos sanguíneos, além da ação indutora de morte celular por apoptose. Também é descrita na literatura uma via específica de

ativação do reparo através da interação do ozônio com o fator nuclear eritrocitário 2 (Nrf2). A translocação do fator é aumentada pela ozonização suave que ativa a transcrição dependente de Keap1 e é mediada por Nrf2, que impulsionadas por elementos responsivos a oxidantes codificadores de proteínas, envolvem-se em diversas funções metabólicas importantes, sendo o estresse oxidativo uma delas. O Nrf2 é capaz de bloquear essa função metabólica, induzindo a produção de enzimas antioxidantes, entre elas as subunidades catalíticas e moduladoras do glutamato, cisteína ligase e da glutathione peroxidase⁸⁹.

No presente estudo, a desgranulação dos MCs foi crescente do 5º para o 10º em todos os grupos experimentais, mas esse aumento só apresentou significância para os grupos tratados com ozônio. Esse achado pode não estar relacionado exclusivamente ao processo inflamatório, pois, conforme já citado anteriormente, estudos atuais têm descrito a participação dos MCs na fase proliferativa e de remodelamento do reparo¹⁰³. Apesar de verificar que o gás ozônio e o óleo ozonizado modularam a desgranulação de MCs, os resultados observados em nosso estudo não permitem inferir a influência da desgranulação sobre outras variáveis do reparo, a exemplo da densidade vascular, biossíntese de fibras colágenas e elástica, assim como outros constituintes da MEC, nos períodos avaliados.

Ainda no que diz respeito à eficácia da ozonioterapia na cicatrização de ferimentos, Vinnik¹¹² e colaboradores (2022) realizaram um estudo experimental comparativo, através da análise de feridas infectadas, em ratos Wistar acometidos por diabetes mellitus. Os animais foram submetidos à intervenção cirúrgica no 7º e 14º dias. Os autores comprovaram a eficácia do tratamento combinado com ozonioterapia tópica e ultrassom de baixa frequência. Esse método de tratamento normalizou a taxa de fluxo sanguíneo na fronteira entre o tecido saudável e a ferida infectada, reduziu o tempo de cicatrização da ferida e acelerou os processos de limpeza do exsudado purulento e preenchimento da ferida com tecido de granulação, bem como re-epitelização marginal.

Um outro estudo avaliou os efeitos da injeção subcutânea de ozônio em queimaduras. Nesse estudo, queimaduras de segundo grau superficiais de espessura parcial foram provocadas na parte inferior do dorso dos animais agrupados em três grupos comparativos: controle e dois grupos adicionais que foram submetidos ao tratamento com sulfadiazina de prata e ozônio gás, respectivamente. Na análise das secções teciduais, constatou-se que a cicatrização das feridas no grupo do ozônio foi significativamente mais rápida do que nos outros grupos, de modo que os autores concluíram que a ozonioterapia subcutânea foi mais eficaz do que a sulfadiazina de prata no processo de cicatrização de queimaduras de segundo grau¹¹³.

Para além da ação antimicrobiana e dos efeitos no período inflamatório, linhas de pesquisa têm se dedicado a investigar os efeitos do ozônio sobre outros eventos biológicos do reparo tecidual. Soares¹¹⁴ e colaboradores (2019) demonstraram seu efeito na modulação do fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2), redução do infiltrado inflamatório presente no tecido de granulação, bem como uma maior deposição de colágeno¹¹⁴. Nesse mesmo sentido, um experimento conduzido por Pai¹¹⁵ e colaboradores (2014) avaliou o efeito do óleo ozonizado sob a contratatura da ferida, força tênsil, área de colágeno e atividade do superóxido dismutase na área da ferida, no período de 10 dias. O desfecho encontrado demonstrou que o grupo tratado com óleo ozonizado apresentou melhores resultados para os aspectos avaliados em relação aos outros grupos. Ainda, tal estudo ratifica que a eficácia terapêutica do ozônio tem como potencial mecanismo o estresse oxidativo, ainda que seja necessário um equilíbrio tênue entre sua efetividade e toxicidade¹¹⁶.

Outros estudos se propuseram a investigar a influência da ozonioterapia sob (não seria “sobre” ?) o número de fibroblastos e do colágeno a partir do espessamento de suas fibras. Foi realizado um estudo experimental que comparou o grupo controle com um grupo tratado com óleo de *aloe vera* ozonizado, nos tempos 3º e 7º dias. Os resultados demonstraram significância entre os grupos nos dois tempos propostos, com maior número de fibroblastos, maior biossíntese de colágeno e redução do tamanho da ferida no grupo tratado com óleo de *aloe vera* ozonizado¹¹⁷. Esses resultados diferem do presente estudo, uma vez que a redução da severidade da inflamação no 10º dia foi mais acentuada no GGO em relação ao GOO, o qual apresentou aspectos semelhantes ao grupo controle. Contudo, em relação ao contingente de MCs, os resultados evidenciados tanto pelo GGO quanto pelo GOO demonstraram que o ozônio foi capaz de modular a desgranulação dessas células. Adicionalmente, quanto à indicação do método de aplicação do ozônio, cumpre destacar que outros fatores também devem ser considerados, tais como o custo, o grau de invasividade do tratamento e o potencial de resposta individual à terapia.

Embora haja evidências favoráveis à utilização da ozonioterapia nos estudos experimentais já citados, no tocante à sua aplicabilidade em seres humanos, ainda existe muita divergência sobre sua ação terapêutica. Em uma revisão sistemática da Cochrane, conduzida por Liu¹⁰⁶ e colaboradores (2015), tais autores selecionaram ensaios clínicos randomizados a fim de comparar a ozonioterapia com outra intervenção. Consideraram todos os estudos incluídos na revisão como de baixa ou muito baixa qualidade, e concluíram que a eficácia da ozonioterapia no tratamento de feridas, com base nos três estudos elegíveis para revisão, não

poderia ser avaliada, pois esses apresentavam falhas metodológicas, com amostras muito pequenas para detecção de diferenças clínicas significativas. Sendo assim, a realização de estudos experimentais *in vivo*, como no caso da presente investigação, e aqueles realizados *in vitro* podem contribuir significativamente para a identificação de possíveis alterações teciduais decorrentes da ozonioterapia.

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados no presente estudo, pode se concluir que:

- A análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório monomorfonuclear não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, embora o grupo tratado com o gás tenha exibido um infiltrado inflamatório crônico mais discreto. Os autores sugerem a necessidade de se avaliar também, no futuro, o infiltrado inflamatório polimorfonuclear na fase inicial do reparo cutâneo.

- O estudo histomorfométrico da população de MCs evidenciou que nos grupos submetidos à ozonioterapia, tanto com o gás quanto com o óleo, houve aumento do número de MCs intactos e desgranulados. Os autores sugerem ampliar a análise de outras variáveis do reparo tecidual correspondentes aos períodos do presente estudo, a exemplo da densidade vascular e biossíntese de fibras colágenas e elásticas, assim como correlacioná-las com os MCs.

- Houve maior desgranulação de MCs no 10º dia do período pós-operatório, em todos os grupos experimentais, em especial nos grupos tratados com ozônio. Tal evidência ratifica a participação dos MCs em etapas tardias do reparo, assim como sugere uma aparente modulação da atividade funcional dessas células induzida pela ozonioterapia.

A ozonioterapia com gás pareceu atenuar o infiltrado inflamatório monomorfonuclear no 10º dia, embora esse dado não tenha apresentado significância estatística. Entre os grupos tratados, com base nas variáveis analisadas no presente estudo, não houve diferença em relação ao método de aplicação do ozônio.

REFERÊNCIAS

1. CAMPOS, ACL; BORGES-BRANCO, A; GROTH, AK. Cicatrização de feridas. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo) [online]. 2007, v. 20, n. 1 [Acessado 15 Julho 2022], pp. 51-58. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>>.
2. MARTINS, AFM, *et al.* Perfil epidemiológico de lesões cutâneas crônicas de pacientes internados. Rev enferm UFPE on line. 2021;15:e244519 DOI: <https://doi.org/10.5205/1981-8963.2021.244519>
3. Wulff, Brian C., and Traci A. Wilgus. "Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye?." *Experimental dermatology* 22.8 (2013): 507-510.
4. CINSA, L; GUALBERTO, ACM; LOPES, KHS. Processo cicatricial cutâneo – história natural e perfil de citocinas. Revista interdisciplinar de estudos experimentais, v.5, n. único, p.17-21. 2013.
5. Egozi, Eric I, Ahalia M Ferreira, Aime L. Burns, Richard L. Gamelli and Luisa A. DiPietro. "Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds." *Wound Repair and Regeneration* 11 (2003).
6. Dudeck, Jan, et al. "Directional mast cell degranulation of tumor necrosis factor into blood vessels primes neutrophil extravasation." *Immunity* 54.3 (2021): 468-483.
7. Komi, D.E.A., Khomtchouk, K. & Santa Maria, P.L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clinic Rev Allerg Immunol* 58, 298–312 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w>
8. Souza, pg; Castro, ms; Silva, lp. A Biologia da reparação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.7, n. 3, p.28989-29010 mar 2021. Disponível em: <DOI:10.34117/bjdv7n3-560>.
9. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN and Wood JG (2016) Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front. Immunol.* 6:620. doi: 10.3389/fimmu.2015.00620.
10. BOCCI, V; ZANARDI, I; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Med Gas Res.* 2011 Apr 28;1(1):6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186%2F2045-9912-1-6>>.
11. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol.* 2018 Mar;56:235-241. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.040. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29414657.
12. KIM, HS, *et al.* Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci.* 2009 Jun;24(3):368-74. Epub 2009 Jun 12. Disponível em <<https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.3.368>>.
13. CRUZ, HFO. Avaliação "in vitro" da associação do efeito antimicrobiano do ozônio a veículos e curativos de demora em diferentes períodos de tempo de armazenagem,

Dissertação de mestrado Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, 2006. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/90417>>.

14. PIRES, JR, *et al.* Effect of systemic ozone therapy as a biomodulator of tissue regeneration and inflammatory response in rats. *Rev Odontol UNESP*. 2021;50:e20210046. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1807-2577.04621>>.
15. GONZALEZ, ACO, *et al.* Wound healing - A literature review* * Work conducted at the Gonçalo Moniz Research Center – Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM/Fiocruz), Salvador, BA, Brazil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [online]. 2016, v. 91, n. 5 [Accessed 15 July 2022] , pp. 614-620. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>>.
16. Marchesini, BF. & Ribeiro, SB. (2020). Efeito da ozonioterapia na cicatrização de feridas. *Fisioterapia Brasil*, 21(3), 281–288. Disponível em: <<https://doi.org/10.33233/fb.v21i3.2931>>.
17. Andrade, T. de O. S. .; Dantas, J. B. de L.; Cerqueira, C. B. S. de .; BADARÓ, P. .; Marchionni, A. M. T. .; Andrade, A. R. A. P. Comparative study of the effectiveness of ozone therapy and laser photobiomulation upon experimental wound repair: systematic review. *Research, Society and Development, [S. l.]*, v. 11, n. 5, p. e58911528650, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i5.28650. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/28650>. Acesso em: 27 oct. 2023
18. LEAL, EC. & CARVALHO, E. Cicatrização de Feridas: O Fisiológico e o Patológico. *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2014; 9 (3): 133-143. Disponível em: <<http://www.revportdiabetes.com/wp-content/uploads/2017/10/RPD-Vol-9-n%C2%BA-3-Setembro-2014-Artigo-de-Revis%C3%A3o-p%C3%A1gs-133-143.pdf>>.
19. Menezes, M de S., Kelly Borges Fonseca, A., & Moreira de Matos, N. . (2022). Perfil de pacientes com lesões cutâneas hospitalizados em uma unidade de internação de clínica médica. *Health Residencies Journal - HRJ*, 3(15), 95–108. <https://doi.org/10.51723/hrj.v3i15.426>>.
20. BURGESS, J.L.; Wyant, W.A.; Abdo Abujamra, B.; Kirsner, R.S.; Jozic, I. Diabetic Wound-Healing Science. *Medicina* 2021, 57, 1072. <https://doi.org/10.3390/medicina57101072>.
21. AFONSECA, MA, et al. Repercussão de doenças sistêmicas no reparo tecidual. *Revista Bahiana de Odontologia*, Salvador, dez. 2012; 3(1): 63-75. Disponível em: <<https://www5.bahiana.edu.br/index.php/odontologia/article/view/32/71>>.
22. Oskeritzian, Carole A.. “Mast Cells and Wound Healing.” *Advances in wound care* 1 1 (2012): 23-28 .
23. Oliveira,G. R. B.; Rodrigues, A.L.B S Cicatrização de feridas cirúrgicas e crônicas: um atendimento ambulatorial de enfermagem Escola Anna Nery *Revista de Enfermagem*, vol. 7, núm. 1, abril, 2003, pp. 104-113 Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Brasil
24. DOS SANTOS CÔRTEZ, Selma Márcia. O Tratamento de ferida: um artigo de revisão. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*, v. 2, n. 1, p. 55-64, 2013.

25. Razyieva, Kamila, Yevgeniy Kim, Zharylkasyn Zharkinbekov, Kuat Kassymbek, Shiro Jimi and Arman Saparov. "Immunology of Acute and Chronic Wound Healing." *Biomolecules* 11 (2021).
26. Wang X.. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. Emerging roles of ozone in skin diseases 2018 Feb 28;43(2):114-123. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.002. PMID: 29559592.
27. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013 Jan;229(2):176-85. doi: 10.1002/path.4133. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23096265.
28. Brockmann L, Giannou AD, Gagliani N, Huber S. Regulation of TH17 Cells and Associated Cytokines in Wound Healing, Tissue Regeneration, and Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):1033. Published 2017 May 11. doi:10.3390/ijms18051033
29. DiToro D., Harbour S.N., Bando J.K., Benavides G., Witte S., Laufer V.A., Moseley C., Singer J.R., Frey B., Turner H., et al. Insulin-like growth factors are key regulators of T Helper 17 regulatory T cell balance in autoimmunity. *Immunity*. 2020;52:650–667.e610. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.013
30. CORREIA, KVD. & MEDRADO, ARAP. Participação dos mastócitos no reparo tecidual e em lesões inflamatórias bucais – Uma revisão de literatura. *Revista Bahiana de Odontologia*, Salvador, jan./jun. 2013; 4(1):27-36. Disponível em: <<https://www5.bahiana.edu.br/index.php/odontologia/article/view/112/152>>.
31. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 20;21(22):8790. doi: 10.3390/ijms21228790. PMID: 33233704; PMCID: PMC7699912.
32. ZHANG, X.; Alanazi, Y.F.; Jowitt, T.A.; Roseman, A.M.; Baldock, C. Elastic Fibre Proteins in Elastogenesis and Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 4087. <https://doi.org/10.3390/ijms23084>
33. Pugliese, L. S., Medrado, A. P., Reis, S. R. de A., & Andrade, Z. de A.. (2003). The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17(4), 307–313. <https://doi.org/10.1590/S1517-74912003000400003>
34. GILFILLAN, AM; AUSTIN, SJ; METCALFE, DD. Mast Cell Biology: Introduction and Overview. *Adv Exp Med Biol*. 2011 ; 716: 2–12. doi:10.1007/978-1-4419-9533-9_1. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398748/pdf/nihms389436.pdf>>.
35. MUKAI, K, *et al*. Mast cells as sources of cytokines, chemokines and growth factors. *Immunol Rev*. 2018 March ; 282(1): 121–150. doi:10.1111/imr.12634. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5813811/pdf/nihms932144.pdf>>.
36. MOLDERINGS, GJ. Mast cells function in physiology and pathophysiology. *Biotrend Review*, vol. 5, no. 1, pp. 1–9, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/256120760_Mast_cell_function_in_physiology_and_pathophysiology>.

37. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000;12(6):624-31. doi: 10.1016/S0952-7915(00)00154-0
38. Dudeck J, Kotrba J, Immler R, Hoffmann A, Voss M, Alexaki VI, et al. Directional mast cell degranulation of tumor necrosis factor into blood vessels primes neutrophil extravasation. *Immunity*. 2021 Mar 9;54(3):468-83. doi: 10.1016/j.immuni.2020.12.017
39. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*. 1997;77(4):1033-79. doi: 10.1152/physrev.1997.77.4.1033
40. Paraguassú GM, De Castro ICV, Vasconcelos RM, Guarda MGda, Rodriguez TT, Ramalho MJP, et al. Effect of LED phototherapy ($\lambda 630 \pm 20 \text{nm}$) on mast cells during wound healing in hypothyroid. *Mechanisms for Low-Light Therapy IX*. 2014;8932:233-40. doi: 10.1007/s10103-013-1419-x
41. Galli J, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(2):135-42. doi: 10.1038/ni1158
42. Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, et al. Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by Fc ϵ RI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J Exp Med*. 2004 Apr;199(7):959-70. doi: 10.1084/jem.20030680
43. Rech RR, Graça DL. Mastócitos em condições normais e patológicas—revisão. *Vet Not*. 2006;12:51-60.
44. Santos PP, Freitas VS, Freitas R de A, Pinto LP, Souza LB de. Relação entre mastócitos e células T na inflamação. *Odontol lín-Cient (Online)*. 2010;9(3):215-7.
45. Galli SJ, Gaudenzio N, Tsai M. Mast cells in inflammation and disease: recent progress and ongoing concerns. *Ann Rev Immunol*. 2020 Apr;38:49-77. doi: 10.1146/annurev-immunol-071719-094903
46. Ribatti D. The staining of mast cells: a historical overview. *Int Arch Allergy Immunol* 2018;176;55-60. doi: 10.1159/00048753
47. Bloom GD. A short history of the mast cell. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1984;414:87-92. doi: 10.3109/0001648840912288
48. Valent P, Akin C, Hartmann K, Nilsson G, Reiter A, Hermine O, et al. Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts. *Theranostics*. 2020 Aug 29;10(23):10743-68. doi: 10.7150/thno.46719
49. Gaje PN, Ceausu RA, Jitariu A, Ioan Stratul S, Rusu L-C, Popovici RA, et al. Mast cells: key players in the shadow in oral inflammation and in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *BioMed Res Int*. 2016;2016:9235080. doi: 10.1155/2016/9235080
50. Jamur MC, Grodzki ACG, Berenstein EH, Hamawy MM, Siraganian RP, Oliver C. Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood*. 2005 Jun;105(11) 4282-9. doi: 10.1182/blood-2004-02-0756
51. Galli SJ. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol*. 2000 Jan;7(1):32-9. doi: 10.1097/00062752-200001000-00007

52. Gilfillan AM, Austin SJ, Metcalfe DD. Mast cell biology: introduction and overview. *Adv Esp Med Biol*. 2011;716:2-12. doi: 10.1007/978-1-4419-9533-9_1
53. Pincha N, Yousaf Hajam E, Badarinath K, Rao Batta SP, Masudi T, Dey R, et al. PAI1 mediates fibroblast–mast cell interactions in skin fibrosis. *J Clin Invest*. 2018 May;128(5):1807-19. doi: 10.1172/JCI99088
54. Dong J, Chen L, Zhang Y, Jayaswal N, Mezghani I, Zhang W, et al. Mast cells in diabetes and diabetic wound healing. *Adv Ther*. 2020;37(11):4519-37. doi:10.1007/s12325-020-01499-4
55. Bacci S. Fine regulation during wound healing by mast cells, a physiological role not yet clarified. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb;23(3):1820. doi: 10.3390/ijms23031820
56. McNeil BD, Pundir P, Meeker S, Han L, Udem BJ, Kulka M, et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature*. 2015 Mar;519(7542):237-41. doi: 10.1038/nature14022
57. Correia KVD, Medrado ARAP. Participação dos mastócitos no reparo tecidual e em lesões inflamatórias bucais – Uma revisão de literatura. *Rev Bahiana de Odontologia*. 2013 jan-jun;4(1):27-36. doi: <https://doi.org/10.17267/2596-3368dentistry.v4i1.112>
58. PG, Castro MS, Silva LP. A Biologia da reparação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo. *Braz J Dev*. 2021 mar;7(3):28989-9010. doi: 10.34117/bjdv7n3-560
59. Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cells and collagen fibrillogenesis. *Histochem Cell Biol*. 2020 Jul;154:21-40. doi: <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01875-9>
60. Roberts LJ, Lewis RA, Oates JA, Austen KF. Prostaglandin, thromboxane, and 12-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid production by ionophore-stimulated rat serosal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1979 Nov;575(2):185-92. doi: 10.1016/0005-2760(79)90020-1
61. Drube S, Müller S, Weber F, Wegner P, Böttcher-Loschinski R, Gaestel M, et al. IL-3 is essential for ICOS-L stabilization on mast cells, and sustains the IL-33-induced ROR γ t+ Treg generation via enhanced IL-6 induction. *Immunology*. 2021;163:86-97. doi: <https://doi.org/10.1111/imm.13305>
62. Asai H, Yamamoto R, Kuromiya K, Takamura R, Jin W, Kurosaki H, et al. A Rapid and Sensitive Determination of Histamine in Mast Cells Using a Didansyl Derivatization Method. *Int Arch Allergy Immunol*. 2022;183(10):1050-5. doi: 10.1159/000525588
63. Herrera-Heredia SA, Hsu H-P, Kao C-Y, Tsai Y-H, Yamaguchi Y, Roers A, et al. Heparin is required for the formation of granules in connective tissue mast cells. *Front Immunol*. 2022 Nov;13:1000405. doi: 10.3389/fimmu.2022.1000405
64. Theoharides TC, Perlman AI, Twahir A, Kempuraj D. Mast cell activation: beyond histamine and tryptase. *Expert Rev Clin Immunol*. 2023 Jun;19(6):639-54. doi: 10.1080/1744666X.2023.2200936
65. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005 jan;41(1):27-51. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000100004>

66. Kondeti V, Al-Azzam N, Duah E, Thodeti C, Boyce J, Paruchuri S. Leukotriene D4 and prostaglandin E2 signals synergize and potentiate vascular inflammation in a mast cell-dependent manner through cysteinyl leukotriene receptor 1 and E-prostanoid receptor 3. *J Allerg Clin Immunol*. 2016 Jan;137:289-98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.06.030>
67. Zhao Y, Yang S-Y, Shen J, Deng K, Li Q, Wang Y, et al. Interaction between regulatory T cells and mast cells via IL-9 and TGF- β production. *Oncol Letters*. 2020 Dec; 20(6):360. doi: <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12224>
68. McHale C, Mohammed Z, Gomez G. Human Skin-Derived Mast Cells Spontaneously Secrete Several Angiogenesis-Related Factors. *Front Immunol*. 2019 Jun;10:1445. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01445>
69. Joulia R, L'Faqihi F-E, Valitutti S, Espinosa E. IL-33 fine tunes mast cell degranulation and chemokine production at the single-cell level. *J Allerg Clin Immunol*. 2017 Aug;140(2):497-509.e10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.049>
70. Desai A, Jung M-Y, Olivera A, Gilfillan AM, Prussin C, Kirshenbaum AS, et al. IL-6 promotes an increase in human mast cell numbers and reactivity through suppression of suppressor of cytokine signaling 3. *J Allerg Clin Immunol*. 2016;137(6):1863-71.e6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.05>
71. Ling MF, Luster AD. Allergen-Specific CD4(+) T Cells in Human Asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Mar;13(Suppl 1):S25-30. doi: [10.1513/AnnalsATS.201507-431MG](https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201507-431MG)
72. Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, et al. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front Immunol*. 2018 Aug 13;9:1873. doi: [10.3389/fimmu.2018.01873](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01873)
73. Cruvinel W de M, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS de, Silva NP da, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*. 2010 Jul;50(4):434-47. doi: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>
74. Parizi ACG, Barbosa RL Parizi JLS, Nai GA. A comparison between the concentration of mast cells in squamous cell carcinomas of the skin and oral cavity. *Anais Bras Dermatol*. 2010;85(6):811-8.
75. Kirshenbaum A. Regulation of mast cell number and function. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000 Jun;14(3):497-516.
76. Varricchi G, de Paulis A, Marone G, Galli SJ. Future Needs in Mast Cell Biology. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4397. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20184397>
77. Majorini MT, Cancila V, Rigoni A, Botti L, Dugo M, Triulzi T, et al. Infiltrating Mast Cell-Mediated Stimulation of Estrogen Receptor Activity in Breast Cancer Cells Promotes the Luminal Phenotype. *Cancer Res*. 2020 June;80(11):2311-24. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3596>
78. Hanes MR, Giacomantonio CA, Marshall JS. Mast Cells and Skin and Breast Cancers: A Complicated and Microenvironment-Dependent Role. *Cells*. 2021 Apr;10(5):986. doi: [10.3390/cells10050986](https://doi.org/10.3390/cells10050986)

79. Silva EZM da, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(10):698-738. doi: 10.1369/0022155414545334
80. Souza Junior DA, Santana A, da Silva EZM, Oliver C, Jamur MC. The role of mast cell specific chymases and tryptases in tumor angiogenesis. *BioMed Res Int.* 2015;2015:142359. doi: 10.1155/2015/142359
81. HÄNNINEN, K. HAWK, M.; MCCALLISTER, C.; SCHAFER, Z. T. Contribution of excited ozone and oxygen molecules to the formation of the stratospheric ozone layer. *Environment and Ecology Research*, v. 7, n. 3, p. 121-134, 2019. DOI: <https://doi.org/10.13189/eer.2019.070302>.
82. TRAVAGLI, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: A review. *Mediators of Inflammation*, Volume 2010, Article ID 610418, 9 pages.
83. COSTA, M. F. Y. B. et al. Applicability of ozone therapy in Veterinary Oncology: biochemical and immunological aspects. *Journal of Continuing Education in Veterinary Medicine and Animal Science of CRMV-SP, São Paulo*, v. 20, n. 1, 2022, e38237. DOI: <https://doi.org/10.36440/recmvz.v20i1.3>.
84. Francisco Javier Hidalgo-Tallón, Luis Miguel Torres-Morera, Jose Baeza-Noci, Maria Dolores Carrillo-Izquierdo, Rosa Pinto-Bonilla (2022) Updated Review on Ozone Therapy in Pain Medicine. *Frontiers in Physiology*, n.13.
85. Silva, K. H. G., Cunha, E. V., Galdino, V. L., & Hipolito, A. F. (2021). Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do ozônio gasoso e do óleo ozonizado. *Revista Master-Ensino, Pesquisa e Extensão*, 6(11), 179-189.
86. BACCI, S. Fine Regulation during Wound Healing by Mast Cells, a Physiological Role Not Yet Clarified. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 5;23(3):1820. doi: 10.3390/ijms23031820. PMID: 35163741; PMCID: PMC8836533. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8836533/pdf/ijms-23-01820.pdf>.
87. SADOWSKA J. et al. Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2008; 151:85-91. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2007. 10.004.
88. BOCCI, L. et al. Oxygen-ozone in orthopaedics: EPR detection of hydroxyl free radicals in ozonetreated “nucleus pulposus” material. *Riv Neuroradiol.* p. 55-9, 2005
89. GALIÈ, M, *et al.* The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4009. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6720777/#:~:text=Nrf2%20prevents%20oxidative%20stress%20through,thioredoxin%20reductase%201%20\(TXN1%20and](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6720777/#:~:text=Nrf2%20prevents%20oxidative%20stress%20through,thioredoxin%20reductase%201%20(TXN1%20and).
90. Kashiwazaki J, Nakamura K, Hara Y, Harada R, Wada I, Kanemitsu K. Evaluation of the Cytotoxicity of Various Hand Disinfectants and Ozonated Water to Human Keratinocytes in a Cultured Epidermal Model. *Adv Skin Wound Care.* 2020 Jun;33(6):313-318. doi: 10.1097/01.ASW.0000658592.51430.ea. PMID: 32427787.
91. SMITH NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res.* 2017;7(3):212-219.

92. Silva, Kalyandra Hellen Gomes, et al. "Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do ozônio gasoso e do óleo ozonizado." *Revista Master-Ensino, Pesquisa e Extensão* 6.11 (2021): 179-189.
93. BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Atenção à Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares [internet]. Brasília (DF); 2015 Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_praticas_integrativas_complementares_2ed.pdf
94. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev.* 2019 Jan 1;99(1):665-706. doi: 10.1152/physrev.00067.2017. PMID: 30475656; PMCID: PMC6442927.
95. Aarabi S, Bhatt KA, Shi Y, Paterno J, Chang EI, Loh SA. Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB*, 21:3250-3261, 2007
96. Babuççu O. OZON TERAPİ: MİT VE GERÇEK. *Türk Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Dergisi.* 2011; 19(3): 105-112.
97. Beghdadi, Walid, Lydia Celia Madjene, Marc Benhamou, Nicolas Charles, Gregory Gautier, Pierre Launay and Ulrich Blank. "Mast Cells as Cellular Sensors in Inflammation and Immunity." *Frontiers in Immunology* 2. 2011
98. Huang HJ, Yu B, Lin QR, Wang BW, Chen HQ. [Effect of ozone water on the inflammation and repair in infected wounds]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010 Mar;30(3):515-8. Chinese. PMID: 20335124.
99. Soter, Nicholas A.. "Mast cells in cutaneous inflammatory disorders." *The Journal of investigative dermatology* 80 1 Suppl (1983): 22s-5s
100. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research.* 2009 Oct 1;37(5):1528-42.
101. Derakhshan T, Boyce JA, Dwyer DF. Defining mast cell differentiation and heterogeneity through single-cell transcriptomics analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Oct;150(4):739-747. doi: 10.1016/j.jaci.2022.08.011. PMID: 36205448; PMCID: PMC9547083.
102. Shiota, Naotaka et al. "Pathophysiological Role of Skin Mast Cells in Wound Healing after Scald Injury: Study with Mast Cell-Deficient W/WV Mice." *International Archives of Allergy and Immunology* 151 (2009): 80 - 88.
103. Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cells and collagen fibrillogenesis. *Histochem Cell Biol.* 2020 Jul;154:21-40. doi: <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01875-9>.
104. Özyay Y, Güzel S, Yumrutaş Ö, Pehlivanoglu B, Erdoğan İH, Yıldırım Z, Türk BA, Darcan S. Wound Healing Effect of Kaempferol in Diabetic and Nondiabetic Rats. *J Surg Res.* 2019 Jan;233:284-296. doi: 10.1016/j.jss.2018.08.009. Epub 2018 Sep 4. PMID: 30502261.
105. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

106. Liu J, Zhang P, Tian J, Li L, Li J, Tian JH, Yang K. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015, Issue 10. Art. No.: CD008474. DOI: 10.1002/14651858.CD008474.pub2.S
107. ILVA, K. H. G.; CUNHA, E. V.; GALDINO, V. L. .; HIPOLITO, A. F. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do ozônio gasoso e do óleo ozonizado. *Revista Master - Ensino, Pesquisa e Extensão, [S. l.]*, v. 6, n. 11, p. 179–189, 2021. DOI: 10.47224/revistamaster.v6i11.163.
108. Colombo M, Gallo S, Garofoli A, Poggio C, Arciola CR, Scribante A. Ozone Gel in Chronic Periodontal Disease: A Randomized Clinical Trial on the Anti-Inflammatory Effects of Ozone Application. *Biology (Basel)*. 2021 Jul 6;10(7):625. doi: 10.3390/biology10070625. PMID: 34356480; PMCID: PMC8301177.
109. Saglam E, Alinca SB, Celik TZ, Hacısalihoglu UP, Dogan MA. Evaluation of the effect of topical and systemic ozone application in periodontitis: an experimental study in rats. *J Appl Oral Sci*. 2019 Nov 28;28:e20190140. doi: 10.1590/1678-7757-2019-0140. PMID: 31800874; PMCID: PMC6886394.
110. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Aug;10(8):1343-74. doi: 10.1089/ars.2007.1957. PMID: 18522489; PMCID: PMC2932530.
111. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, Leaper D, Georgopoulos NT. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J*. 2017 Feb;14(1):89-96. doi: 10.1111/iwj.12557. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26688157; PMCID: PMC7950185.
112. Vinnik, Yurii Semenovich, Lyudmila Viktorovna Kochetova, Anna Borisovna Kulikova and Nadezhda N. Medvedeva. “Effectiveness of ozone therapy and ultrasound in regeneration of an infected wound in an experiment.” *Siberian Medical Review* (2022).
113. Karakaya, Emre, Aydıncan Akdur, Ebru Hatice Ayvazoğlu Soy, Coşkun Araz, Alev Ok Atılğan, Eda Özturan Özer, Tuğçe Şençelikel and Mehmet Haberal. “Effect of Subcutaneous Topical Ozone Therapy on Second-Degree Burn Wounds in Rats: An Experimental Study.” *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* (2021).
114. Soares, Thayná M. L. Morais, Roberta M. F. G. Araújo, Patrícia F. Meyer, Eric A. F. Oliveira, Rodrigo M. V. Silva, Eneida M. Carreiro, Edvaldo P. Carreiro, Verônica G. Belloco, Bruno A. L. A. Mariz & Jacks Jorge-Junior (2019): Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats, *Growth Factors*.
115. Pai SA, Gagangras SA, Kulkarni SS, Majumdar AS. Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. *Indian J Pharm Sci*. 2014 Jan;76(1):87-92. PMID: 24799744; PMCID: PMC4007261.
116. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res*. 2011 Dec 20;1:29. doi: 10.1186/2045-9912-1-29. PMID: 22185664; PMCID: PMC3298518.
117. Taqwim Hidayat A, Thohar Arifin M, Nur M, Muniroh M, Susilaningsih N. Ozonated *Aloe vera* Oil Effective Increased the Number of Fibroblasts and Collagen Thickening in the

Healing Response of Full-Thickness Skin Defects. *Int J Inflamm.* 2021 Feb 9;2021:6654343.
doi: 10.1155/2021/6654343. PMID: 33628417; PMCID: PMC7886587.

ANEXO 1

POTENCIAL DE AÇÃO DOS MASTÓCITOS EM DIFERENTES CONTEXTOS BIOLÓGICOS

Sarah Souza Lima¹; Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado²

¹Bacharel Interdisciplinar em Saúde, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA; ²Cirurgiã-dentista, Mestre, Doutora em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Professora Associada de Patologia e do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA

Os mastócitos (MCs), células originárias da medula óssea, são caracterizados por conter grânulos em seu citoplasma e secretar substâncias como heparina e histamina, entre outros mediadores químicos. Essas células desempenham papéis em diferentes processos biológicos, tais como inflamação, tumorigênese e alergias. São células ativas biologicamente que interagem com outros tipos celulares e com os constituintes da matriz extracelular. Dessa forma, podem modular o curso de uma determinada condição ou doença sistêmica, assim como desencadear ações localizadas no tecido onde se acha presente. O objetivo da presente revisão narrativa de literatura é apresentar uma visão geral a respeito das diferentes atuações dos mastócitos e relatar em quais contextos biológicos estão inseridos. Foi realizada uma busca ativa com o termo mastócito em base de dados científicas, para consultar a literatura clássica sobre esta temática, bem como estudos atuais que enfatizam as vias de sinalização celular e avanços na área da biologia molecular. Observou-se que, atualmente, técnicas mais sensíveis de biologia molecular permitiram caracterizar a assinatura biológica dos MCs e determinar receptores e mediadores químicos implicados nas doenças descritas. O avanço do conhecimento acerca dos MCs, seus mecanismos de ação, bem como os produtos de secreção tem ajudado a elucidar a patogênese de diversas condições, do mesmo modo que impulsiona o desenvolvimento de terapias com o objetivo de regular a ação dessas células. Contudo, a despeito do grande número de estudos que contemplam a caracterização dos MCs, sua participação na patogênese de muitas doenças ainda representa um campo aberto à investigação científica e deve ser mais explorado, em especial, para fins terapêuticos.

Palavras-chave: Mastócitos; inflamação; alergias; angiogênese; tumor.

VIOLÊNCIA INFANTO JUVENIL INTRAFAMILIAR NO CONTEXTO DA PANDEMIA DA COVID-19

Sileuza da Silva Meira Rocha¹, Ana Rita Sokolonski Antòn²

¹Psicóloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA; ²Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA, Professora Adjunta de Bioquímica e do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia – UFBA;

A COVID-19 é uma patologia que tem o vírus SARS-CoV-2 como seu agente etiológico. Com início em 2019 na cidade de Wuhan na China, essa doença teve rápida disseminação no mundo, consequência grave que

ANEXO 2

FACULDADE ADVENTISTA DA BAHIA

Certificamos que a proposta para pesquisa intitulada: "Avaliação termográfica de feridas de ratos sob efeito de terapias biomoduladoras" foi submetido ao CEUA da FADBA para avaliação de protocolos para uso de animais em ensino. Registrada com o protocolo de n.67/2019, sob a responsabilidade de Antônio Márcio Teixeira Marchionni – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), apresenta-se na condição de pendente:

- Identificar a empresa que realizará a coleta dos animais no item 12.2 e o descarte dos mesmos no item 12.3.
- Acrescentar vigência da pesquisa.

Parecer emitido em 11/09/2019 pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da FADBA com CIAEP: 01.0039.2013, DOU EM 05/09/2013.

FINALIDADE	() ENSINO (x) PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência da autorização	? /11/2019 - ? /11/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
N. de animais	50
Peso/Idade	250g / 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Subrilab: Suprimento de laboratório e Biotério Ltda.

Coordenação CEUA: Helen Meira Cavalcanti Pola



Instituto de Ciências da Saúde Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela.
CEP: 40110-100 Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>