Yglésio Luciano Moyses Silva de Souza

**Avaliação dos efeitos da ozonioterapia no tratamento
da infecção intra-abdominal em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Belchor Fontes

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Yglésio Luciano Moyses Silva de

Avaliação dos efeitos da ozonioterapia no tratamento da infecção intra-abdominal em ratos / Yglésio Luciano Moyses Silva de Souza. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Belchor Fontes.

Descritores: 1.Interleucina-6 2.Interleucina-10 3.Sepse/terapia 4.Ozônio/uso terapêutico 5.Pulmão/trauma 6.Ceco/cirurgia 7.Ratos

USP/FM/SBD-418/09

Yglésio Luciano Moyses Silva de Souza

**Avaliação dos efeitos da ozonioterapia no tratamento
da infecção intra-abdominal em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Belchor Fontes

São Paulo

2009

Dedico este trabalho

A Bianca, amor, amiga, conselheira e porto seguro

A minha mãe, Marlene, por toda a sua luta buscando proporcionar-me todas as chances de crescer e tentar ser melhor a cada dia

A Gregória, por ter ajudado minha mãe na difícil tarefa de criar-me

Aos meus professores e amigos, José Antonio e Manoel Lages, que sempre me deram todo o apoio em todas as etapas de formação

Ao meu primo e irmão, Anderson, por sua força e exemplo de reconstrução da vida, todos os dias

Ao amigo Marco de Luna, pelas muitas horas dispensadas e por todo o incentivo durante estes quase dois anos

Aos meus amigos e professores do Reino Infantil, da Universidade Federal do Maranhão e da Residência no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo

Agradecimentos

Ao Dr. Belchor Fontes, meu orientador, homem de grande experiência e visão em pesquisa científica.

Ao Dr. Joilson Martins, que abraçou a causa deste trabalho e da publicação desta tese, participando ativamente da sua elaboração.

À Ana Maria Cattani, Elizabete Minami e Lucy Takasaki, por todo apoio na prática laboratorial. Obrigado pelo carinho de vocês.

Às Dras. Vera Capelozzi, Katia Ramos e ao Dr. Rafael Moura, por toda ajuda na análise histológica deste trabalho.

À Dra. Paulina Sannomiya, por ter-me ajudado com as dosagens das citocinas e pelo apoio.

Às senhoras Sônia e Tânia, do Departamento de Fisiopatologia Experimental, por ajudar-me em todos os momentos em que precisei.

Ao Prof. Samir Rasslan e ao Dr. Riad Younes por terem disponibilizado a estrutura do LIM-62 para a realização deste trabalho.

Aos Drs. Tércio de Campos e Paulo Celso Massarollo pelas valiosas contribuições na aula de qualificação

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 2ª. Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
3 MÉTODOS	8
3.1 Protocolo experimental e anestesia	8
3.2 Procedimentos operatórios	10
3.3 Dosagem das citocinas e quimiocina	13
3.4 Análise histológica pulmonar	15
3.5 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar	16
3.6 Análise de sobrevida	19
3.7 Análise estatística	21
4 RESULTADOS	23
4.1 Citocinas e quimiocina	23
4.2 Análise histológica pulmonar	26
4.3 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar	28
4.4 Análise de sobrevida	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	39
7 ANEXOS	40
8 REFERÊNCIAS	44
Apêndices	

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

CAPPesq- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CINC- Chemokine-induced neutrophil chemoattractant

EBD- Evans blue dye

EP- Erro-padrão

FAP- Fator de ativação plaquetária

FMUSP- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HE- Hematoxilina-eosina

i.p.- intraperitoneal

i.v.- intra-venoso

ICB- Instituto de Ciências Básicas

IL- Interleucina

LIM- Laboratório de Investigação Médica

LPA- Lesão pulmonar aguda

LPC- Ligadura e punção de ceco

LPS- lipopolissacarídeos

MIP- macrophageal inflammatory protein

mL- mililitros

nm- nanômetros

ng- nanograma

O₂- oxigênio

O₃- ozônio

PBS- phosphate buffered saline

pg- picograma

P25- percentil 25

P75- percentil 75

PF- peso fresco

PS- peso seco

TNF- Tumor necrosis factor

UV- ultra-violeta

V.-vide

Vs- *versus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema de distribuição dos animais de acordo com os objetivos do estudo.....	10
Figura 2-	Exposição e ligadura do ceco.....	11
Figura 3-	Punção cecal com agulha 22g.....	12
Figura 4-	Demonstração da saída do material fecal após a punção.....	12
Figura 5-	Injeção do EBD na veia dorsal do pênis.....	17
Figura 6-	Lavagem pulmonar com PBS.....	18
Figura 7-	Injeção intra-peritoneal do O ₂	20
Figura 8-	Coleta da mistura gasosa O ₂ /O ₃	21
Figura 9-	Níveis de CINC-1 após 24 horas.....	24
Figura 10-	Níveis de IL-10 após 24 horas.....	26
Figura 11-	Amostras da histologia pulmonar.....	28
Figura 12-	Análise de sobrevivência.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Níveis séricos de IL-6 (pg/mL) após 24 horas.....	25
Tabela 2-	Escore de histologia pulmonar.....	27
Tabela 3-	Permeabilidade vascular pulmonar quantificada pelo método do extravasamento do EBD.....	29
Tabela 4-	Análise do tempo médio de sobrevida.....	30

RESUMO

Souza, YLMSS. *Avaliação dos efeitos da ozonioterapia no tratamento da infecção intra-abdominal em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 53 p.

INTRODUÇÃO: O ozônio (O_3) é encontrado na natureza e também pode ser produzido no corpo humano através da ativação de anticorpos. Seus efeitos anti-bactericidas são descritos na literatura, mas esses dados são controversos quanto a um potencial efeito benéfico da ozonioterapia no tratamento de certos tipos de infecção. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da aplicação intraperitoneal (*i.p.*) de uma mistura gasosa de ozônio em um modelo de ligadura e punção de ceco (LPC) em ratos, através da dosagem de interleucinas (IL)-6, IL-10 e da quimiocina CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant), da lesão pulmonar aguda (LPA) e da análise das taxas de sobrevivência. **MÉTODO:** Quatro grupos de ratos Wistar foram utilizados para análise de cada objetivo (CTR, LPC, LPC+ O_2 e LPC+ O_3). Os animais do grupo CTR foram submetidos somente a laparotomia. O grupo LPC foi submetido aos procedimentos de LPC. Os outros grupos foram submetidos à LPC e receberam injeção (*i.p.*) da mistura gasosa correspondente, administrada a cada 12 horas durante o período de observação. Os níveis séricos de IL-6, CINC-1 e IL-10 foram determinados por imuno-ensaio (enzyme linked immunosorbent assay- ELISA). A LPA foi avaliada através da histologia pulmonar e quantificada através do método do extravasamento pulmonar do Azul de Evans. Os animais da análise de sobrevivência foram observados por cinco dias. Os valores obtidos foram

expressos como médias $\pm$ erro-padrão da média (EP) ou medianas mais percentis 25 e 75(P25; P75), de acordo com a distribuição dos dados. Considerou-se significativo $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Os ratos do grupo CTR exibiram os menores níveis de CINC-1 ($p < 0,01$). O grupo LPC+O₃ teve níveis menores de CINC-1 comparado a LPC+O₂ e LPC ($p < 0,05$). Os níveis de IL-10 do grupo CTR foram menores do que nos outros 3 grupos($p = 0,02$) . Não houve diferenças entre os outros 3 grupos ($p = 0,85$). IL-6 foi significativamente menor para o grupo CTR ($30,8 \pm 4,8$) quando comparado a todos os outros grupos ($p < 0,001$). LPC+O₃ e LPC+O₂ exibiram níveis menores quando comparados ao grupo LPC ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos LPC+O₃ e LPC+O₂ ($p = 0,54$). O escore de histologia pulmonar foi menor para CTR ($p = 0,02$). Os outros grupos não apresentaram diferenças significantes intergrupos ($p = 0,3$). Os valores dos coeficientes de extravasamento pulmonar do Azul de Evans foram menores para LPC+O₃ quando comparado aos grupos LPC+O₂ e LPC ($p = 0,02$), porém não houve diferença na comparação com CTR. O grupo CTR teve o maior tempo de sobrevivência (110 ± 10 h) comparado com os outros grupos, ou seja, LPC ($57,3 \pm 10,4$ h), LPC+O₂ ($71 \pm 12,9$ h) e LPC+O₃ ($52,1 \pm 8$), os quais não apresentaram diferenças entre si quanto à sobrevivência ($p = 0,4$). **CONCLUSÃO:** No presente estudo experimental em ratos, a ozonioterapia teve um benefício potencial na modulação da resposta inflamatória e na LPA, mas não influenciou as taxas de sobrevivência dos animais. **DESCRITORES:** IL-6, IL-10, CINC-1, sepse, ligadura e punção de ceco, lesão pulmonar aguda.

SUMMARY

Souza YLMS. *Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats* [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2009. 53 p.

INTRODUCTION: Ozone (O_3) is found in nature and also can be produced in the human body through activation of antibodies. Its antibacterial effect has been described in the literature, but these data are controversial regarding a benefic role of O_3 therapy in the treatment of certain types of infection.

OBJECTIVE: To evaluate the effects of intraperitoneal (*i.p.*) application of an O_3 gas mixture in a rat model of cecal ligation and puncture (CLP), by analyzing interleukin (IL)-6, IL-10 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 levels, acute lung injury (ALI) and survival rates.

METHOD: Four animal groups were used (SHAM, CLP, CLP+ O_2 and CLP+ O_3). SHAM animals were submitted solely to laparotomy. CLP group was submitted to cecal ligation and puncture. The other groups were submitted to CLP and received injections (*i.p.*) of the corresponding gas mixture every 12 hours during the observation period. The serum concentrations of IL-6, CINC-1 and IL-10 were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ALI was evaluated with pulmonary histology and quantitated by means of the Evans blue dye (EBD) lung leakage method. For survival analysis, animals were observed for 5 days. Values were expressed as means $\pm$ SEM or medians (P25; P75), according to the data distribution. A $p < 0,05$ was considered significant.

RESULTS: SHAM rats had the lowest levels of CINC-1 compared to all other groups ($p<0,01$). CLP+O₃ group had lower levels of CINC-1 compared to CLP+O₂ and CLP ($p<0,05$). SHAM IL-10 levels were the lowest compared to the 3 other groups ($p=0,02$). There were no differences between the other 3 groups ($p=0,85$). IL-6 was significantly lower for SHAM compared to all groups ($p<0,001$). CLP+O₃ and CLP+O₂ had lower levels when compared to CLP ($p<0,01$). Comparison between groups CLP+O₃ and CLP+O₂ showed no significant difference ($p=0,54$). Pulmonary histology score was lower for SHAM ($p=0,02$). The other groups presented no statistical difference when compared to each other ($p=0,3$). EBD lung leakage values were lower to CLP+O₃ compared to CLP+O₂ and CLP ($p=0,02$). SHAM group had the longest survival time (110 ± 10 h) compared to all other groups ($p=0,002$). CLP ($57,3\pm 10,4$ h), CLP+O₂ ($71 \pm 12,9$ h) and CLP+O₃ ($52,1 \pm 8$ h), which did not show difference on survival compared to each other ($p=0,4$). **CONCLUSION:** In this rat model of sepsis, ozone therapy had a potential benefit in the modulation of inflammatory response and ALI, but no improvement on survival rates was observed.

KEYWORDS: IL-6, IL-10, CINC-1, sepsis, acute lung injury, cecal ligation and puncture.

1 INTRODUÇÃO

O paciente com sepse, apesar dos inúmeros avanços terapêuticos e dos cuidados de Terapia Intensiva, constitui-se ainda em um desafio para os médicos. O diagnóstico precoce da sepse é fundamental para um tratamento bem-sucedido e a incidência desta vem aumentando significativamente nas últimas décadas, provavelmente devido ao envelhecimento da população e à maior incidência de doenças crônico-degenerativas, que tornam os pacientes mais suscetíveis às infecções ^{1,2}.

A peritonite infecciosa pode ser ocasionada por perfuração intestinal resultante de várias condições, incluindo trauma, doença inflamatória intestinal, isquemia intestinal e perfuração neoplásica. A infecção local inicia uma cascata de liberação de mediadores inflamatórios, incluindo interleucinas (IL), tais como IL-1 β , IL-10, fator de necrose tumoral-- α (tumoral necrosis factor-TNF- α) e outros agentes como fator de ativação plaquetária (FAP), leucotrienos e tromboxanos, todos participantes do desenvolvimento da sepse e do choque séptico ^{3,4}.

Em linhas gerais, o tratamento da infecção peritoneal associa o controle da fonte de contaminação à irrigação cavitária intra-operatória com soluções fisiológicas, reposição volêmica e cobertura antibiótica ampla. O uso intra-operatório de substâncias coadjuvantes tópicas para otimizar a desinfecção da cavidade abdominal, tais como antibióticos, antissépticos, substâncias imuno- estimulantes, dentre outras, mantém-se controverso ⁵.

O ozônio (O_3) foi descoberto por Christian Friedrich Schönbein em 1840. É um gás formado pela adição de um terceiro átomo à molécula de oxigênio (O_2) através de uma descarga elétrica em camadas de ar atmosférico ou pela ação dos raios ultra-violeta (UV)⁶. É uma molécula de meia-vida de vinte minutos, porém é muito instável em tecidos vivos, chegando a uma meia-vida de apenas um segundo⁷.

O ozônio tem um altíssimo potencial de oxidação, inativando bactérias, vírus e fungos. Sua metabolização leva à produção de moléculas de oxigênio, além de aldeídos, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, que interagem quase que instantaneamente com componentes das membranas celulares, citoplasma e ácidos nucleicos⁸. Por conta dessas propriedades, o efeito microbicida do ozônio tem sido objeto de vários estudos⁹⁻¹⁴.

O uso do O_3 na prática clínica, baseado no seu potencial antibiótico, ainda é bastante criticado por conta dos seus efeitos colaterais já relatados, relacionados à formação de radicais livres^{15,16}. Apesar disso, o O_3 apresenta efeitos benéficos no sistema imune relacionados à modulação da atividade fagocítica nos macrófagos peritoneais¹⁷ e alveolares¹⁸, responsáveis pela primeira linha de defesa contra bactérias e/ou suas toxinas. Burgassi *et al.*¹⁹, em 2009, realizou um estudo *in vitro* testando a atividade antibacteriana do O_3 contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Concluíram que altas concentrações de O_3 inativaram 100% do crescimento dessas bactérias quando suspensas em soluções salinas, porém, quando 5% de plasma humano foram adicionados a esse meio de cultura, o O_3 era ineficaz

como agente bactericida. Os autores sugeriram que os componentes do plasma humano inibiram a oxidação das membranas e de ácidos nucléicos bacterianos.

Ozmen *et al.* ²⁰, em 1993, utilizaram solução salina ozonizada no tratamento da peritonite fecal em ratos, constatando redução da mortalidade e da formação de abscessos intra- cavitários. Bulynin e Glukhov, em 1999, citados por Molla-Neto ²¹, aplicaram spray de solução ozonizada sob pressão na cavidade abdominal de humanos para tratamento de peritonites e observaram redução significativa da mortalidade.

Schulz *et al.* ²², em 2003, conduziram um estudo experimental em ratos que eram submetidos a um pré-tratamento (pré-condicionamento) com pneumoperitônio de ozônio (5% de O₃, 95% de O₂, 80mL/kg) antes da indução de uma peritonite polimicrobiana. Não houve casos de morbidade ou mortalidade relacionadas ao pré-condicionamento com ozônio. O mesmo estudo ainda verificou uma melhora das taxas de sobrevida em 35,5% no grupo submetido ao pré-tratamento com ozônio comparado ao grupo que foi submetido ao pré-tratamento com ar ambiente intraperitoneal. Contudo, esse estudo testou três concentrações diferentes de O₃ (10µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL) e a redução da mortalidade foi observada apenas com concentrações de 10µg/mL. Outro ponto de interesse nesse mesmo estudo é que os autores definiram sobrevida como o término do período de observação de 120 horas. Não houve menção ao tempo médio de sobrevida dos animais (em horas), nem montagem de curvas de sobrevida.

Torossian *et al.*²³, em 2004, realizaram um outro estudo sobre pré-tratamento com uma mistura oxigênio/ ozônio(10µg/mL, 80 mL/kg, *i.p.*) em ratos submetidos a sepse peritoneal através da inoculação de fezes humanas em suas cavidades abdominais. As taxas de sobrevida foram similares quando se comparou um grupo submetido ao pré-tratamento com O₃ a um grupo onde não foi realizado pré-tratamento (35% contra 50%, $p=0,1$). O mesmo estudo analisou os níveis de TNF- α , IL-6 e proteína inflamatória de macrófagos (macrophageal inflammatory protein- MIP-2) séricos uma hora após a indução da sepse. Houve uma elevação significativa da MIP-2 ($p<0,002$) e do TNF- α ($p<0,001$), porém não houve elevação de IL-6 ($p=0,5$) nos ratos submetidos ao pré-tratamento com O₃. MIP-2 estimula o recrutamento de neutrófilos e a migração destes para os tecidos infectados. Poder-se-ia interpretar estes resultados como um efeito potencializador do O₃ no sistema imune dos animais, mas também como um estímulo pró-inflamatório excessivo. Uma limitação desse estudo foi o fato da análise de sobrevida ter comparado um grupo com pré-tratamento com ozônio a um grupo controle sem qualquer tratamento (ar ambiente, dióxido de carbono ou oxigênio), não se podendo retirar o viés da presença do pneumoperitônio.

Bette *et al.*²⁴ (2006), propuseram um estudo sobre pré-tratamento com ozônio (*i.p.*) por 5 dias antes da indução de peritonite em ratos, onde associaram injeções intra-musculares (*i.m.*) de piperacilina- tazobactam em duas doses diferentes (65mg/kg e 130mg/kg) ao tratamento com O₃. Analisaram taxas de sobrevida, parâmetros hematológicos e a expressão de

citocinas. Dois grupos-controle foram utilizados (pré-tratamento com ar e com oxigênio a 100%). O pré-tratamento com ozônio melhorou a sobrevivência em até 93% no grupo em que foi associado à piperacilina-tazobactam (130mg/kg). Também detectaram um aumento no número de leucócitos (granulócitos e linfócitos) até o sexto dia do experimento nos animais submetidos ao pré-tratamento com O₃ ($p<0,05$). Postularam um efeito significativo do ozônio no sistema imune inato (granulócitos) e no sistema imune adaptativo (linfócitos). Outro achado do estudo foi a redução do TNF- α e da IL-1 β nos animais submetidos ao pré-condicionamento com O₃ associado ao tratamento com antibiótico quando comparado ao tratamento isolado com o antibiótico.

Outro estudo com pré-tratamento com ozônio (*i.p.*)²⁵ em baixas doses (0,8 mg/kg) antes da indução da peritonite fecal demonstrou redução significativa dos níveis séricos de creatinina, aspartato amino-transferase (AST) e alanina amino-transferase (ALT) quando comparado ao grupo não submetido a pré-condicionamento com O₃, demonstrando um possível benefício do pré-condicionamento na resposta sistêmica à infecção peritoneal.

Rodriguez *et al.*²⁶, em 2007, conduziram um estudo em ratos comparando um tratamento intraperitoneal com ozônio a um tratamento com ozônio e levofloxacino (*i.p.*) na sepse peritoneal induzida pela injeção intraperitoneal de fezes de rato diluídas (cada grupo com n=9). Encontraram um benefício significativo da mistura O₃ / levofloxacino comparado ao

tratamento exclusivo com O₃ (77% contra 0% de mortalidade após 24 horas).

Ainda no estudo de Rodriguez *et al.*²⁶, um grupo de ratos submetido somente a peritonite sem tratamento algum apresentou taxa de sobrevida após 48h de observação de 22%, número que contrasta com taxas de sobrevida de publicações clássicas sobre mortalidade após a indução de sepse peritoneal por ligadura e punção cecal^{27,28}. Outro ponto a ser destacado deste estudo²⁶ é o benefício óbvio de um esquema antibiótico comparado a qualquer outro tratamento tópico exclusivo (neste caso, o ozônio) no manejo da sepse peritoneal.

Silva *et al.*⁵ (2009), em modelo de insuflação de ozônio (62µg/mL, *i.p*) durante 5 minutos (mantendo uma pressão intra-abdominal de 3mmHg) em ratos submetidos a sepse peritoneal, não encontrou efeitos tóxicos sistêmicos nesses animais e ainda demonstrou que o efeito bactericida do O₃ é superior ao do gás carbônico.

Há uma série de estudos *in vitro* sobre as propriedades antimicrobianas e sobre os efeitos celulares do ozônio^{9,10,13,14,18,19,29,30} e também estudos *in vivo*^{5,6,12,20,21,24,25,31} analisando suas propriedades terapêuticas, mas a maioria deles foi baseado em pré-condicionamento/pré-tratamento, que é um esquema terapêutico de difícil aplicabilidade em pacientes com sepse peritoneal. Os resultados conflitantes de alguns desses estudos, aliados à escassez de estudos mais amplos sobre os efeitos do ozônio no tratamento da infecção abdominal e da sepse peritoneal induzidas, serviram de estímulo para que realizássemos o presente estudo.

2 OBJETIVOS

Avaliar, em animais submetidos à infecção intra-abdominal e tratados com uma mistura gasosa de oxigênio/ozônio (95% de O₂/ 5% de O₃, *i.p.*), as seguintes variáveis:

1. A resposta inflamatória, mediante dosagens dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (CINC-1 e IL-6) e antiinflamatória (IL-10).
2. A lesão pulmonar aguda (LPA), determinada por meio da análise da histologia pulmonar e do método do extravasamento do Azul de Evans.
3. Taxas de mortalidade e tempo médio de sobrevivência.

3 MÉTODO

3.1 Protocolo experimental e anestesia

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fisiopatologia Cirúrgica (LIM-62) da 3ª Divisão de Clínica Cirúrgica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 250-350g, provenientes do Biotério da FMUSP, mantidos em gaiolas com no máximo 5 animais, em ambiente com temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas, com ciclos de luz de 12h e período de adaptação de 5 dias. Foram oferecidas ração própria (Purina®) para espécie e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) (v. Apêndice) e realizado em conformidade com as diretrizes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*³².

Para cada objetivo do trabalho, os animais foram randomizados, após a exposição do ceco, em quatro grupos, a saber:

1) CTR: animais submetidos à laparotomia e exposição do ceco.

2) LPC: animais submetidos à laparotomia mais ligadura e punção de ceco (LPC).

3) LPC+O₂: animais submetidos à laparotomia mais LPC e tratados com O₂ a 100% (20mL/kg, *i.p.*).

4) LPC+O₃: animais submetidos à laparotomia mais LPC e que foram tratados com uma mistura gasosa (20mL/kg, *i.p.*) contendo 5% de ozônio (102 µg/mL) e 95% de oxigênio.

As durações dos períodos de observação dos animais desses grupos variaram de acordo com as variáveis analisadas e serão especificados nos respectivos tópicos dentro deste capítulo. Laparotomia e LPC foram realizadas sob anestesia geral mediante indução em câmara de inalação com halotano (impregnado em algodão), seguida pela injeção (*i.p.*) de pentobarbital sódico (50mg/kg)^{33,34,35}, visando a obtenção de uma anestesia profunda e prolongada, que permitiu a execução de todos os procedimentos sem sofrimento para os animais.

Para a análise de sobrevivência, foram utilizados 50 animais (CTR=10, LPC=12, LPC+O₂=14, LPC+O₃=14). Para avaliação da lesão pulmonar aguda por meio do método do extravasamento do Azul de Evans, foram utilizados 40 animais (CTR=10, LPC=10, LPC+O₂=10, LPC+O₃=10). A análise da histologia pulmonar e a dosagem de citocinas foram realizadas simultaneamente em um grupo de 44 animais (CTR=10, LPC=11, LPC+O₂=13, LPC+O₃=10). O desenho experimental e a distribuição dos animais estão resumidos na Figura 1.

Figura 1- Esquema de distribuição dos animais de acordo com os objetivos do estudo.

3.2 Procedimentos operatórios

Os animais foram submetidos a um jejum de 8 horas antes dos procedimentos cirúrgicos. Todos os animais foram submetidos a tricotomia abdominal com lâmina de bisturi nº 23 e antissepsia com solução de iodo-povidona tópica. Os grupos LPC, LPC+O₂ e LPC+O₃ foram submetidos a uma laparotomia mediana de 2 cm de extensão utilizando-se bisturi de lâmina nº 15. Um afastador auto-estático foi posicionado de forma a permitir uma boa exposição do ceco, que foi ligado com um fio de seda 3.0 imediatamente distal à junção íleo-cecal, evitando-se assim a obstrução intestinal (Figura 2).

Figura 2- Exposição e ligadura do ceco.

Após a ligadura, o ceco foi puncionado uma única vez em sua margem anti-mesentérica com uma agulha 22g (Figura 3). O ceco (ligado) foi pressionado até expelir-se uma pequena quantidade de fezes através do orifício da punção (Figura 4).

Figura 3- Punção cecal com agulha 22g.

Figura 4- Demonstração da saída do material fecal após a punção.

O ceco e o material fecal foram recolocados na cavidade abdominal e à síntese da laparotomia foi realizada em dois planos (músculo-aponeurótico e pele), mediante sutura continua com nylon 4.0. Os animais do grupo CTR foram submetidos à laparotomia, exposição do ceco e fechamento imediato da cavidade abdominal, realizada da mesma forma que nos outros grupos. Os animais foram mantidos sob temperatura em torno de 37° C no pós-operatório imediato, até o fim da recuperação anestésica. Ração e água (com dipirona a 0,5%) foram oferecidos *ad libitum* no pós-operatório ^{27,34}.

3.3 Dosagem das citocinas e quimiocina

A quantificação das citocinas IL-6, IL-10 e da quimiocina CINC-1 (análoga da IL-8 humana no rato) foi realizada em amostras de plasma colhidas 24 horas após a LPC, utilizando-se o método de enzima- imuno-ensaio (enzyme- linked immunosorbent assay- ELISA) por Duo-set (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).

Inicialmente, na placa com 96 poços, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de captura, anti-IL-6 (4 µg/mL), anti-IL-10 (4 µg/mL), ou anti-CINC-1 (100 µg/mL). Após incubação por uma noite a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada 3 vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 300 µL/poço). Em seguida, foi realizada a reação de

bloqueio adicionando-se 200 μ L/poço de albumina sérica bovina a 2% em PBS (phosphate- buffered saline) e incubação por 1 hora à temperatura ambiente (20 a 26°C). A placa foi novamente lavada 3 vezes com o tampão de lavagem. Adicionaram-se, em duplicata, 100 μ L/poço do padrão ou das amostras, procedendo-se à incubação da placa por 2 horas à temperatura ambiente.

Para a curva padrão utilizaram-se IL-6, IL-10, ou CINC-1 recombinantes nas concentrações de 15,625; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; 1000; 2000; e 4000 pg/mL. Após repetir o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de detecção biotilado para IL-6 (400 ng/mL), IL-10 (100 ng/mL) ou CINC-1 (50 μ g/mL), e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente.

Ao término da incubação, o ciclo de lavagem da placa foi repetido, e em seguida foram adicionados 100 μ L/poço da enzima estreptoavidina peroxidase na proporção 1: 200 de enzima: PBS com 0,05% de *tween* e incubação por 1 hora à temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição de 100 μ L/poço de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e incubação (30-60 minutos) à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 50 μ L/poço de H₂SO₄ (1N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm, imediatamente após o bloqueio da reação ³⁶. Os valores foram anotados em pg/mL em ficha protocolo específica (Anexo A) e submetidos à análise estatística.

3.4 Análise histológica pulmonar

Vinte e quatro horas após o procedimento inicial (laparotomia no grupo CTR e LPC para os outros grupos), todos os animais foram anestesiados mediante indução com halotano seguida por uma injeção de pentobarbital sódico (50mg/kg, *i.p.*). Uma esternotomia mediana foi realizada para acesso à cavidade torácica e 5 mL de sangue foram coletados através de punção intra-cardíaca com uma agulha 22g. Esta amostra de sangue foi utilizada para a dosagem das citocinas (IL-6 e IL-10) e quimiocina (CINC-1).

A eutanásia foi realizada mediante secção do ventrículo esquerdo com tesoura, seguida de exsanguinação do animal. Uma biópsia do pulmão esquerdo foi realizada e a amostra foi fixada em formaldeído a 4%. As lâminas foram coradas com hematoxilina- eosina (HE) e submetidas à análise de alterações morfológicas ³⁷. As alterações morfológicas visualizadas incluíram diferentes graus de extensão (EXT) do comprometimento pulmonar, edema (Ed), hemorragia (He), congestão (Con) e infiltrado celular por polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN). Como a extensão do comprometimento pulmonar e das alterações morfológicas não foi homogênea, procedeu-se à análise semi-quantitativa. Um escore foi estabelecido para a extensão do envolvimento pulmonar e a intensidade das alterações morfológicas, resultando no escore final, obtido pela multiplicação referida extensão pela soma da intensidade de cada alteração morfológica, conforme detalhado a seguir:

0: ausência de comprometimento pulmonar.

1: comprometimento de 1 a 25% do parênquima pulmonar.

2: comprometimento de 26 a 50% do parênquima pulmonar.

3: comprometimento de >50% do parênquima pulmonar.

Em síntese, o escore final foi representado pela seguinte fórmula:

$EXT \times (Ed + Con + He + PMN + MN)$.

Os valores dos escores de cada grupo foram submetidos à análise de normalidade e posteriormente a comparações intergrupos. A avaliação histológica (anexo B) foi realizada por 2 patologistas, sem o conhecimento do grupo a que pertenciam os animais, evitando-se assim a indução de resultados.

3.5 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar

A permeabilidade vascular pulmonar foi quantificada através do teste de extravasamento do corante azul de Evans (Evans blue dye- EBD) ^{38,39}. Vinte e quatro horas após o procedimento inicial (laparotomia no grupo CTR e LPC para os outros grupos), os animais foram anestesiados com halotano inalatório associado a pentobarbital sódico (50 mg/kg, *i.p.*). Após a anestesia, foram injetados 20 mg/kg de EBD (em uma concentração de 25 mg/mL EBD em água) na veia dorsal do pênis dos animais (Figura 5).

Figura 5- Injeção de EBD na veia dorsal do pênis.

Após 15 minutos, a incisão abdominal foi reaberta em todos os animais. A eutanásia foi realizada através de secção da veia cava inferior, seguindo-se a abertura da cavidade torácica e perfusão pulmonar com 50 mL de solução tampão (PBS com pH 7,4) por aproximadamente 3 minutos, injetados por cânula inserida na artéria pulmonar. Essa etapa teve como objetivo retirar o sangue contido nos vasos pulmonares, para que não houvesse interferência do EBD contido nesses vasos nos valores da permeabilidade pulmonar (Figura 6).

Figura 6- Lavagem pulmonar com PBS.

Após dissecação e remoção do bloco cardiopulmonar, o lobo pulmonar inferior esquerdo foi dividido em duas partes que foram pesadas para obtenção do peso fresco (PF). Uma delas foi colocada em estufa a 100° Celsius por 24 horas para obtenção do peso seco (PS). A relação peso seco/peso fresco (%PS/PF) desta amostra foi calculada. A outra amostra foi submersa em solução de formamida (4mL de formamida /g tecido úmido) por 24 horas de maneira que o corante presente no tecido foi extraído na solução de formamida. O valor de absorbância do corante foi detectado por uma microplaca leitora com comprimento de onda de 620 nm e depois comparado aos valores de absorbância de uma série de diluições-padrão do EBD em formamida, sendo depois convertido em μg de EBD/mL da solução.

Com base neste valor, a quantidade de EBD presente na amostra pulmonar fresca (μg de EBD/g de tecido fresco) foi determinada. Finalmente, a relação “%PS/PF” foi usada para converter o valor do tecido fresco em um valor em μg de EBD/g tecido seco, que foi anotado como coeficiente de extravasamento pulmonar de EBD, que é uma medida da permeabilidade vascular pulmonar e, por conseguinte, da lesão pulmonar aguda. Os valores dos coeficientes de extravasamento pulmonar de EBD foram anotados (Anexo C) e submetidos à análise estatística.

3.6 Análise da sobrevida

Todos os grupos foram observados durante 5 dias (120 horas) a partir do procedimento inicial, por dois pesquisadores diferentes, onde cada um cumpriu turnos de 12 horas (Anexo D). O grupo LPC+O₂ foi submetido a injeções intra-peritoniais de O₂ a 100% (20mL/kg) a cada 12 horas durante cinco dias, mediante punção no quadrante inferior direito do abdome com uma agulha 22g. As injeções foram iniciadas uma hora após o término da LPC (Figura 7).

Figura 7- Injeção intra- peritoneal do O₂.

O grupo LPC+O₃ recebeu injeções de uma mistura gasosa (20mL/kg, *i.p.*), constituída por 5% de ozônio (102 µg/mL) e 95% de oxigênio, produzida por um gerador de ozônio MVM[®] (Multivácuo[®], Campinas, Brasil), da mesma forma que no grupo LPC+O₂ recebeu o oxigênio. A coleta da mistura gasosa O₂/O₃ é demonstrada na figura 8. Os animais foram submetidos à indução anestésica com halotano antes das injeções, de forma a minimizar o seu sofrimento. Ração e água (com dipirona 0,5%) *ad libitum* foram ofertadas no período de recuperação. Os animais dos grupos CTR e

LPC foram observados por 5 dias. O tempo a partir do procedimento inicial foi anotado em horas e as curvas de sobrevivência foram desenhadas utilizando-se o teste de Log-rank.

Figura 8- Coleta da mistura gasosa O_2/O_3 .

3.7 Análise estatística

A análise de normalidade foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição normal são apresentados como médias $\pm$ Erro-padrão (EP) da média. Os dados com distribuição não-paramétricas são apresentados como medianas (Md) e percentis 25 e 75

[Md(P25; P75)]. Os dados paramétricos foram comparados pela Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas quando necessárias. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado quando se encontraram dados numéricos com distribuição anormal, seguido por comparações pelo teste de Student-Newman-Keuls, quando aplicáveis. A análise de sobrevida foi realizada pelo teste de Log-rank. Adotou-se um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. No presente trabalho, utilizamos o programa Sigmastat[®] versão 3.5 (Systat Software, Inc. San Jose, USA) para a análise estatística e confecção dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Citocinas e quimiocina

Os níveis séricos de CINC-1 e IL-10 foram expressos como medianas (P25; P75) e os de IL-6 como médias $\pm$ EP em decorrência da análise de normalidade dos valores numéricos das amostras.

Os níveis séricos de CINC-1 (pg/mL) foram significativamente menores para o grupo LPC+O₃ [951,3(582,6; 1111,5)] *versus* LPC+O₂ [1700(1300;3928,1)] e LPC [3555(3066,8;4404)] ($p<0,05$). O grupo CTR teve menores níveis de CINC-1 (47) *versus* os outros grupos ($p<0,01$). Não houve diferença significativa entre os grupos LPC e LPC+O₂. Esses resultados são apresentados na figura 9.

Figura 9- Níveis de CINC-1 após 24 horas.

Teste de Kruskal-Wallis para os níveis de CINC-1 24 horas após o procedimento inicial. CTR teve níveis menores quando comparado aos outros grupos. LPC+O₃ teve níveis menores de CINC-1 comparados a LPC e LPC+O₂. ^x CTR comparado aos outros grupos ($p < 0,01$). * LPC+O₃ *versus* LPC e LPC+O₂ ($p < 0,05$). Os valores são medianas (P25;P75) expressos em pg/mL.

Os níveis de IL-6 (pg/mL) foram significativamente menores para o grupo CTR ($30,8 \pm 4,8$) *versus* os outros grupos ($p < 0,001$). LPC+O₃ e LPC+O₂ obtiveram níveis menores *versus* o grupo LPC ($p < 0,05$). A comparação entre os grupos LPC+O₃ e LPC+O₂ não demonstrou significância ($p = 0,54$). Os dados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1- Níveis séricos de IL-6 (pg/mL) após 24 horas

Grupo	n	Média	EP
CTR *	10	30,8	4,8
LPC #	11	695	65,3
LPC+O ₂	13	386,3	40,9
LPC+O ₃	10	321,3	35,2

ANOVA com múltiplas comparações pelo método de Bonferroni. Os valores são médias $\pm$ EP expressos em pg/mL. * CTR *versus* os outros grupos ($p < 0,05$). # LPC *versus* LPC+O₂ e LPC+O₃. ($p < 0,01$). Não houve diferença entre LPC+O₃ e LPC+O₂ ($p = 0,54$).

Os níveis séricos de IL-10 (pg/mL) para os quatro grupos foram: CTR= 50,1 (38,8; 67); LPC=98,1(56,1; 598); LPC+O₂= 273,6 (152; 314,8) e LPC+O₃=199,5(107; 289). O teste de Kruskal- Wallis demonstrou menores níveis de IL-10 para CTR *versus* os outros grupos ($p = 0,02$). Não houve diferenças significantes entre os grupos LPC, LPC+O₂ e LPC+O₃ ($p = 0,85$). Os resultados estão apresentados na figura 10.

Figura 10- Níveis de IL-10 após 24 horas (pg/mL).

Teste de Kruskal- Wallis para níveis séricos de IL-10. CTR obteve menores níveis *versus* outros grupos. Não houve diferença entre LPC, LPC+O₂ e LPC+O₃ ($p=0,85$). Os valores são medianas (P25; P75) expressos em pg/mL. * CTR *versus* os outros grupos ($p=0,02$).

4.2 Histologia pulmonar

Para a análise da histologia pulmonar e dosagem de citocinas, utilizaram-se 10 animais para o grupo CTR e, inicialmente, 13 animais para os 3 grupos com LPC. Dois animais do grupo LPC e 3 animais do grupo LPC+O₃ apresentaram amostras de plasma inadequadas para dosagem (plasma hemolisado), então optou-se por eliminar esses animais. Os animais do grupo CTR tiveram o menor escore de histologia pulmonar [3(2;4)]

comparado aos outros grupos ($p=0,002$). Os escores de histologia pulmonar foram semelhantes nos grupos LPC+O₂, LPC+O₃ e LPC ($p=0,31$). Os resultados dos escores estão apresentados na tabela 2 e as amostras das lâminas apresentadas na figura 11.

Tabela 2- Escore de histologia pulmonar

Grupo	N	Mediana	P25	P75
CTR	10	3 *	2	4
LPC	11	10	5	12
LPC+O ₂	13	6	3,75	10,5
LPC+O ₃	10	8	6	8

Teste de Kruskal–Wallis. Não houve diferença entre os grupos LPC, LPC+O₂ e LPC+O₃ ($p=0,31$). Valores expressos em medianas (P25; P75). * CTR *versus* todos os outros grupos ($p=0,002$).

Figura 11- Amostras da histologia pulmonar.

A (CTR); B (LPC); C(LPC+O₂); D(LPC+O₃). Observa-se menos reação inflamatória em A, com redução da hemorragia comparando-se a B, C, D. Microscopia óptica. HE. 200x

4.3 Avaliação da permeabilidade vascular pulmonar

Os valores do coeficiente do EBD para os quatro grupos foram expressos como medianas (P25; P75). Os valores foram 62,5 no grupo CTR, 56,1 no grupo LPC, 88,2 no grupo LPC+O₂ e 28,4 no grupo LPC+O₃. Houve diferença estatisticamente significativa do grupo LPC+O₃ comparado a LPC+O₂ e LPC ($p=0,02$). A comparação do grupo LPC+O₃ com o grupo CTR não mostrou diferença significativa. Os resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3- Permeabilidade vascular pulmonar quantificada pelo método do extravasamento do EBD.

Grupo	N	Mediana	P25	P75
CTR	10	62,5	39	71,3
LPC	10	56,1	52,7	109,1
LPC+O ₂	10	88,2	53,6	151,1
LPC+O ₃ *	10	28,4	18,4	51,3

Teste de Kruskal-Wallis para o extravasamento do EBD. Houve diferença entre LPC+O₃ *versus* LPC+O₂ e LPC ($p=0,02$). Não houve diferença entre LPC+O₃ *versus* a CTR ($p=0,14$). Os valores são medianas (P25; P75) expressas em μg de EBD/g tecido seco. * $P=0,02$ para LPC+ O₃ comparado a LPC+O₂ e LPC.

4.4 Análise de sobrevida

Para a análise de sobrevida, utilizaram-se 10 animais para o grupo CTR, devido à baixa morbidade da laparotomia associada à exposição cecal. Os grupos que foram submetidos a procedimentos de LPC tinham inicialmente 14 animais, porém dois animais do grupo LPC morreram após a anestesia e foram excluídos da análise.

No grupo CTR, a sobrevida média foi de $110 \pm 10\text{h}$, sendo registrado apenas um óbito, observado no período pós-anestésico. Todos os outros grupos tiveram um tempo de sobrevida inferior ao do grupo CTR ($p=0,002$). As taxas de mortalidade observadas foram 1/10 (10%) para CTR 9/12 (75%) para o grupo LPC, 6/14 (42,8%) para LPC+ O₂ e 10/14 (71, 4%) para o grupos LPC+O₃. Os animais do grupo LPC+O₂ não foram diferentes quanto

ao tempo de sobrevida quando comparados aos grupos LPC+O₃ e LPC (p=0,4). Esses resultados estão sumarizados na tabela 4. As curvas de sobrevida estão apresentadas na figura 12.

Tabela 4- Análise do tempo médio de sobrevida

Grupo	n	Média	EP
CTR	10	110 *	10
LPC	12	57,4	10,4
LPC+O ₂	14	71	12,9
LPC+O ₃	14	52,1	8

ANOVA com comparações múltiplas pelo método de Bonferroni. Os valores são médias $\pm$ EP expressos em horas. * CTR *versus* todos os outros grupos (p=0,002).

Figura 12- Análise de sobrevida.

Teste Log-rank. Todos os grupos tiveram um tempo de sobrevida inferior ao grupo CTR (p=0.002). * P<0,002 CTR comparados aos outros grupos. Vermelho= CTR; azul=LPC; verde=LPC; amarelo=LPC+O₃.

5 DISCUSSÃO

O tratamento de pacientes com infecção peritoneal continua a despertar o interesse dos pesquisadores em investigar novos métodos terapêuticos, novas drogas e táticas cirúrgicas que possam trazer melhores resultados para os pacientes ⁶.

O ozônio pode exercer atividades de toxicidade no homem e também provocar lesão nos ácidos nucleicos das bactérias. A ozonólise do DNA também foi demonstrada em proteínas e lipídios, que são alvos importantes nas reações do ozônio com as bactérias ²¹. O uso disseminado de antibióticos no tratamento de infecções e o aparecimento de cepas bacterianas resistentes motivam constantemente a procura de novos agentes antimicrobianos, tendo o ozônio passado a ser objeto de vários estudos ^{10,12,13,14, 21}.

Molla-Neto ²¹, em 2004, em dissertação de mestrado, avaliou as repercussões do pneumoperitônio com mistura oxigênio/ozônio em ratos, fazendo uma análise gasométrica e histopatológica e concluiu haver um aumento da pressão arterial de oxigênio (PaO₂) sem alterações histológicas em órgãos abdominais (fígado, baço, íleo) ou no tecido adiposo, quando se utilizou o ozônio em baixa concentração (menor que 10µg/mL) em infusão contínua durante 30 minutos.

A concentração de ozônio comumente empregada para uso terapêutico oscila entre 40 e 120 µg/mL ⁶. Optamos por utilizar uma dose de 102 µg/mL com baixo volume (20mL/kg) visando trabalhar com uma dose

próxima à dose máxima usual, avaliar os possíveis efeitos colaterais relacionados a essa aplicação e ao mesmo tempo diminuir o viés do pneumoperitônio excessivo.

A escolha do modelo de infecção intra-abdominal por ligadura e punção cecal (LPC) foi baseada na fácil execução do método e na homogeneidade dos resultados em termos de mortalidade, bem demonstrada em estudo clássico ²⁷.

No presente estudo, decidimos utilizar 4 grupos de animais: CTR, LPC, LPC+O₂ e LPC+O₃. A decisão em realizar controle com O₂ a 100% foi motivada pelo fato de o ozônio produzido pelo gerador utilizado no estudo ser uma mistura O₂/O₃ (95% de O₂ e 5% de O₃). O grupo LPC objetivou analisar o efeito da peritonite nas variáveis do estudo na ausência de tratamento, comparando-as nos diversos grupos do estudo. O grupo CTR forneceu os valores basais necessários para comparações com os demais grupos submetidos a procedimentos de LPC. Em suma, CTR, LPC e LPC+O₂ funcionaram como 3 grupos-controle distintos para comparação com o grupo LPC+O₃.

A indução anestésica com halotano em câmara fechada foi realizada objetivando-se minimizar o sofrimento dos animais durante a etapa seguinte (anestesia com pentobarbital, *i.p.*) e também diminuir o número de erros de punção peritoneal durante as aplicações (*i.p.*) das misturas gasosas. A escolha do pentobarbital sódico (50mg/kg, *i.p.*) como agente anestésico foi tomada com base na profundidade e duração prolongada do plano anestésico alcançado com sua aplicação, possibilitando a realização de

todos os procedimentos sem intercorrências relacionadas a despertares durante a anestesia. Como as doses subsequentes somente foram necessárias em momentos relacionados à eutanásia, evitou-se contaminação peritoneal adicional por novas injeções intraperitoneais de anestésico. Foi aventada a hipótese de anestésiar os grupos CTR e LPC nos mesmos momentos que os grupos LPC+O₂ e LPC+O₃ (a cada 12 horas iniciando-se 1 hora após o procedimento inicial), ao invés de somente observá-los, porém esta etapa não foi realizada no presente estudo.

O gerador de ozônio escolhido (MVM- Multivácuo[®], Campinas, Brasil) tem a capacidade de sintetizar o ozônio a partir de um fluxo controlado de oxigênio que passa entre dois eletrodos polarizados, produzindo uma descarga por barreira dielétrica. Por meio de medidores de ozônio que trabalham com o método fotométrico (sensibilidade de 0,1 mg/mL) e de um controlador de fluxo de oxigênio (precisão de 0,01L/ min), aferiu-se sua capacidade de produção, o que garantiu doses controladas de O₃ na mistura com O₂⁴⁰.

A LPC teve um efeito significativo na elevação de CINC-1 quando se compararam os níveis de CTR aos níveis de todos os outros grupos. O grupo LPC+O₃ apresentou uma redução significativa nos níveis de CINC-1 quando comparado aos grupos onde foi realizada LPC.

CINC-1 é produzida por células T e macrófagos, exercendo um papel importante na resposta inflamatória atraindo e ativando neutrófilos e macrófagos^{41,42}. Demonstrou-se ainda que, em modelo experimental *in vitro* onde se empregaram amostras de sangue (humano) periférico expostas ao

ozônio, a adesão e quimiotaxia de neutrófilos nas amostras foram eventos independentes da exposição ao ozônio ⁴³. Os níveis séricos de CINC-1 apresentam uma elevação rápida após indução de inflamação em modelos experimentais em ratos, especialmente nas primeiras 8 horas após a lesão ⁴¹ e alcançam concentrações significativamente diferentes dos controles 4, 8 e 24h em modelos experimentais de LPS *in vitro* ⁴⁴.

O provável mecanismo pelo qual o O₃ atuou na modulação da expressão de CINC-1 neste estudo ainda necessita ser elucidado. Foi levantada a hipótese de que a inativação das bactérias pela aplicação tópica (*i.p.*) do ozônio atenuaria a migração de macrófagos, diminuindo a expressão de CINC-1 vinte e quatro horas após a indução da LPC. A realização de análise histológica do peritônio com contagem diferencial de macrófagos poderia acrescentar evidência a essa hipótese.

Observou-se que o grupo CTR apresentou os menores níveis séricos de IL-6 comparado aos outros grupos ($p<0,001$). Os grupos LPC+O₃ e LPC+O₂ apresentaram menores níveis séricos quando comparados ao LPC ($p<0,05$), mas não se observou diferença entre os grupos LPC+O₃ e LPC+O₂ ($p=0,54$).

A IL-6 é secretada pelas células-T e macrófagos e estimula a resposta imune ao trauma, levando à inflamação. Demonstrou-se que a IL-6 é necessária para a resistência e resposta imune contra certas espécies de bactérias, atuando inclusive como um pirógeno fraco ⁴⁵. A inativação de bactérias pelo ozônio ⁵, com conseqüente redução da migração de células

de defesa poderia explicar essa diminuição nos níveis de IL-6. A IL-6 foi a única variável analisada no presente estudo cujos níveis nos grupos LPC+O₂ e LPC+O₃ foram semelhantes entre si e ambas diferentes vs. LPC. Procurando analisar as razões para tal semelhança, constatamos que Niu *et al.* (2009) ⁴⁶ realizaram um estudo com oxigenioterapia hiperbárica em coelhos submetidos a choque endotóxico por LPS. Verificaram que a expressão de IL-6 foi menor nos animais submetidos à oxigenioterapia hiperbárica. A ausência de diferenças entre os grupos LPC+O₂ e LPC+O₃ poderia ser explicada por um potencial aumento da pressão arterial de O₂ (PaO₂), graças à absorção peritoneal do O₂ ⁷, mimetizando, mesmo que parcialmente, os efeitos da oxigenioterapia hiperbárica, reduzindo a expressão de IL-6. Essa hipótese ganha evidência adicional a partir da observação do estudo de Bocci (1996) ⁷, que verificou que o pneumoperitônio de O₂/O₃ (95%/ 5%) aumenta a PaO₂, criando um ambiente semelhante ao da oxigenioterapia hiperbárica e que diminuiria a expressão de IL-6. Porém, é importante salientar que esta hipótese não encontra embasamento no presente estudo. Os mecanismos que explicam a ausência de diferença da expressão de IL-6 entre os grupos LPC+O₃ e LPC+O₂ ainda necessitam ser esclarecidos.

O grupo CTR apresentou os menores níveis de IL-10 comparado aos outros grupos ($p=0,02$). Os grupos onde a LPC foi induzida apresentaram níveis aumentados de IL-10, porém a administração de O₂ e O₃ não teve impacto significativo nos níveis de IL-10 vinte e quatro horas após o procedimento inicial.

A IL-10 é também secretada por células-T e macrófagos, e seus picos na resposta inflamatória podem ser observados até 24 horas após a lesão inicial ⁴⁷. A produção de IL-10 (antiinflamatória) é reconhecida como parte de um mecanismo protetor que suprime a indução de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1. Essa produção é induzida por monócitos e macrófagos durante a sepse ^{48, 49}. Sewnath *et al.* (2001) ⁵⁰ determinaram o papel da IL-10 endógena nas defesas antibacterianas locais e no desenvolvimento da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) durante a sepse peritoneal, indicando que a IL-10 endógena acentua as defesas anti-bacterianas.

Os animais do grupo CTR obtiveram o menor escore de histologia pulmonar em comparação aos outros grupos, demonstrando que a LPC aumenta a lesão no tecido pulmonar 24 horas após sua realização. Além disso, observou-se que não houve efeito benéfico da terapia com ozônio (*i.p.*) no padrão de histologia pulmonar durante esse período. Não foram encontradas membranas hialinas em qualquer uma das amostras, comprometendo a caracterização da lesão pulmonar aguda (LPA) pelo método histológico. A ausência de membranas hialinas ocorreu devido a um intervalo de tempo reduzido (24h) entre a LPC e a eutanásia dos animais.

Membranas hialinas podem ser identificadas à microscopia óptica de 24 a 48 horas após a lesão sistêmica inicial ⁵¹. A presença de edema nas amostras foi uniformemente discreta, razão pela qual decidimos suprimir esta variável no cálculo do escore de histologia pulmonar. A realização da

análise histológica 48 horas após o término dos procedimentos iniciais poderia ter elevado a acurácia da análise da LPA.

O método do extravasamento do EBD foi escolhido por conta de seu valor como um marcador da permeabilidade vascular pulmonar e ao fato de seu aumento estar relacionado à lesão pulmonar aguda. Diferenças na permeabilidade vascular pulmonar podem ser observadas a partir de duas horas após a indução de procedimentos, tais como isquemia/reperfusão intestinal e infusão de lipopolissacarídeos (LPS) ^{38,39}.

Alguns relatos da literatura informam que a inalação aguda de ozônio é associada a uma resposta inflamatória caracterizada por acúmulo de macrófagos nos sítios de lesão tecidual pulmonar ^{52,53}. Essas células, juntamente com as células epiteliais alveolares locais, tornam-se ativadas e liberam mediadores citotóxicos e pró-inflamatórios, tais como o óxido nítrico (NO), que tem papel no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda ^{52,53}. No presente estudo, houve permeabilidade capilar pulmonar (quantificada pelo método do EBD) menos pronunciada no grupo LPC+O₃, o que parece sugerir um efeito antiinflamatório da terapia com ozônio.

Com base no estudo de Silva *et al.* ⁵ (2009), que demonstrou controle adequado da infecção intra-abdominal com a aplicação de ozônio gasoso (*i.p.*), sem efeitos tóxicos significativos, portanto com uma resposta diferente daquela observada com a inalação de O₃ ^{52,53}, consideramos que o controle da infecção intraperitoneal com a terapia com ozônio (*i.p.*) poderia atuar na modulação da cascata inflamatória, reduzindo os valores do coeficiente de

extravasamento do EBD no grupo LPC+O₃ comparado aos grupos LPC+O₂ e LPC e , portanto, atenuando a LPA com 24 horas de observação. Não houve diferença significativa do grupo LPC+O₃ comparado ao grupo CTR. Este achado parece reforçar a possibilidade de que a ozonioterapia tenha alterado a LPA causada pelos procedimentos de LPC.

Para a análise de sobrevida, esta foi anotada em horas a partir do término do procedimento inicial e realizou-se duplo tratamento estatístico, mediante os testes de Kruskal-Wallis e Log-rank, diferentemente da publicação de Schulz *et al.*²² (2003), que não mensurou o tempo médio de sobrevida. Também foram calculadas as taxas de mortalidade dos diferentes grupos, onde não houve diferença entre os grupos submetidos a procedimentos de LPC.

Tendo em vista relatos anteriores da literatura ^{22,23}, a concentração de ozônio utilizada no presente estudo foi de 102µg/mL, com um volume menor (20mL/kg) ao invés de 80mL/kg ^{22,23}, com intenção de evitar os problemas relacionados ao pneumoperitônio excessivo, obtendo uma massa final de ozônio semelhante às das publicações anteriores ^{22,23}.

A LPC aumentou significativamente a mortalidade nos outros três grupos ($p=0,002$). Não houve diferença de mortalidade entre os grupos LPC, LPC+O₂ e LPC+O₃ ($p=0,12$). Observou-se que nosso grupo LPC apresentou uma mortalidade (84%) semelhante à do estudo clássico de mortalidade de Wichterman *et al.* (1980) ²⁷, observada após indução de LPC. Em nosso estudo, a terapia com ozônio não modificou as taxas de mortalidade.

7 CONCLUSÃO

A análise do presente estudo demonstrou que a ozonioterapia (*i.p.*), no tratamento da infecção intra-abdominal:

1. Apresenta efeito na resposta inflamatória, mediante redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (com destaque para CINC-1), porém não houve influência da terapia com O₃ na expressão da citocina antiinflamatória IL-10.
2. Atenua a lesão pulmonar aguda (LPA), determinada através do método do extravasamento do Azul de Evans, mas não modifica a histologia pulmonar 24 horas após a LPC.
3. Não influencia o tempo médio de sobrevida, nem as taxas de mortalidade.

7 ANEXOS

Anexo A- Protocolo de Histologia Pulmonar e Citocinas

Rato n. _____ Peso inicial _____

GRUPO _____

Fim do procedimento inicial: ____/____/____

Hora: ____:____

Volume de sangue coletado ____mL

Intercorrências na coleta? () não () sim.

Qual? _____

Intercorrências na biópsia pulmonar? () Não

() Sim.

Qual? _____

Valores de CINC-1: _____pg/mL

Valores de IL-6: _____pg/mL

Valores de IL-10: _____pg/mL

Anexo B- Protocolo de análise histológica

Rato n. _____ Peso inicial _____

GRUPO _____

Dia _____ Fim do procedimento inicial: ____/____/____

Hora: ____:____

Extensão: () 0 () 1 () 2 () 3

Edema: () 0 () 1 () 2 () 3

Congestão: () 0 () 1 () 2 () 3

Hemorragia: () 0 () 1 () 2 () 3

Polimorfonucleares: () 0 () 1 () 2 () 3

Mononucleares: () 0 () 1 () 2 () 3

Escore final

EXT () x [Ed () + Con () + He () + PMN () + MN ()]: _____

Anexo C- Protocolo EBD

Rato n. _____ Peso inicial _____

GRUPO _____

Fim do procedimento inicial: ____/____/____

Hora: ____:____

Peso pré-infusão do EBD _____

Infusão do EBD às ____:____ do dia ____/____/____

Intercorrências? () não () sim.

Qual? _____

Intercorrências na lavagem pulmonar? () Não

() Sim.

Qual? _____
_____Valor do coeficiente de extravasamento do EBD _____ μg EBD/ g tecido
pumonar seco

Anexo D- Protocolo de observação- Análise de sobrevida

Rato n. _____ Peso _____

GRUPO _____

Fim do procedimento inicial: ____/____/____

Hora: ____:____

DIA1º () ativo () Hipoativo () Óbito / HORA: _____2º () ativo () Hipoativo () Óbito / HORA: _____3º () ativo () Hipoativo () Óbito / HORA: _____4º () ativo () Hipoativo () Óbito / HORA: _____5º () ativo () Hipoativo () Óbito / HORA: _____

Sobrevida de 120 h? () Sim () Não

Tempo de sobrevida _____

8 REFERÊNCIAS

1. Freitas, Flávio G. R. et al. The impact of duration of organ dysfunction on the outcome of patients with severe sepsis and septic shock. *Clinics*. 2008; 63(4):483-8.
2. Rezende E, Silva Junior JM, Isola AM, Campos EV, Amendola CP, Almeida SL. Epidemiology of severe sepsis in the emergency department and difficulties in the initial assistance. *Clinics*. 2008; 63(4):57-64
3. Flowers F, Zimmerman J. Reactive oxygen species in the cellular pathophysiology of shock. *New Horiz*. 1998; 6: 169-80.
4. Freitas, Flávio G. R. et al. The impact of duration of organ dysfunction on the outcome of patients with severe sepsis and septic shock. *Clinics*. 2008; 63(4):483-8.
5. Silva RA, Garotti JEG, Silva RS, Navarini A, Pacheco Jr A. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. *Acta Cir Bras*. 2009; 24(2): 124-7.
6. Guido JCMV. Estudo experimental do efeito do pneumoperitônio de ozônio em ratos previamente inoculados com *E. coli* e bário na cavidade

peritoneal [tese]. São Paulo: Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2006.

7. Bocci V. Ozone as bioregulator: pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *J Biol Regul Homeost Agents* . 1996; 10(2-3): 31-53.

8. O'Neil CA, Van der Vliet A, Hu ML, Kavr H, Cross CE, Lovie S *et. al.* Oxidation of biologic molecules by ozone: the effect of pH. *J Lab Clin Med*; 1993;122:437-505.

9. Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, Chian ES. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl Environ Microbiol*. 1981;41(3):718-23.

10. Dyas A, Boughton BJ, Das BC. Ozone killing action against bacterial and fungal species: microbiological testing of a domestic ozone generator. *J Clin Pathol*. 1983; 36(10): 1102-4.

11. Olson WP. Ozone. *PDA J Pharm Sci Technol*. 1999;53(3):125-8.

12. Steinhart H, Schulz S, Mutters R. Evaluation of ozonated oxygen in an experimental animal model of osteomyelitis as a further treatment option for skull-base osteomyelitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1999; 256(3): 153-7.

13. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Dupre I, Pinna A *et al.* Antibacterial activity of ozonized sunflower oil(oleozon). J Appl Microbiol. 2001; 90(2): 279-84.
14. Fan L, Song J, McRae KB, Walker BA, Sharpe D. Gaseous ozone treatment inactivates *Listeria innocua in vitro*. J Appl Microbio.2007; 103:2657-63.
15. Bhalla DK, Gupta SK, Reinhart PG. Alteration of epithelial integrity, alkaline phosphatase activity, and fibronectin expression in lungs of rats exposed to ozone. J Toxicol Environ Health A. 1999;57(5):329-43.
16. Pryor, WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. Free Radic Biol Med. 1994;17(5): 451-65.
17. Canning BJ, Hmieleski RR, Spannhake EW, Jakab GJ. Ozone reduces murine alveolar and peritoneal macrophage phagocytosis: the role of prostanoids. Am J Physiol. 1991; 261:L277-82.
18. Chatterjee D, Mukherjee SK. Destruction of phagocytosis-suppressing activity of aflatoxin B1 by ozone. Lett Appl Microbiol. 1993; 17:52-4.

19. Burgassi S, Zanardi I, Travagli V, Montomoli E, Bocci V. How much ozone bactericidal activity is compromised by plasma components? .J Appl Microbiol. 2009; 106 (5):1715-21.
20. Ozmen V, Thomas WO, Healy JT, Fish JM, Chambers R, Tacchi E, Nichols RL, Flint LM, Ferrara JJ. Irrigation of the abdominal cavity in the treatment of experimentally induced microbial peritonitis: efficacy of ozonated saline. 1993; 59(5):297-303.
21. Molla Neto OL. Avaliação da repercussão do pneumoperitônio com mistura de oxigênio-ozônio em ratos. Análise gasométrica e histopatológica. São Paulo: Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2004.
22. Schulz S, Rodriguez ZZ, Mutters R, Menendez S, Bette M. Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in lethal polymicrobial sepsis in rats. Eur Surg Res. 2003;35(1):26-34.
23. Torossian A, Ruehlmann S, Eberhart L, Middeke M, Wulf H, Bauhofer A. Pre-treatment with ozonized oxygen (O₃) aggravates inflammation in septic rats. Inflamm Res. 2004; 53(2): S122-5.

24. Bette M, Nuesing RM, Mutters R, Menendez S, Schulz S. Efficiency of tazobactam/piperacilin in lethal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O₃/O₂ pneumoperitoneum. *Shock*. 2006; 1: 26-9.
25. Rodríguez ZZ, Guanche A, Álvarez RG, Rosales FH, Alonso Y, Schulz S. Preconditioning with ozone/oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with fecal peritonitis. *Inflamm Res*. 2009; 58 (7): 371-5.
26. Rodriguez ZZ, Cerero SM, Alvarez R, Schulz S. Effect of ozone/oxygen mixture combined with levofloxacin in a modelo of peritoneal sepsis in the rat. *Redvet*. 2007; 8(9):1-7.
27. Wichterman, KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*. 1980; 29:189-201
28. Hyde SR, Stith RD, McCallum RE. Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. *Infect Immun*. 1990;58(3): 619-24
29. Bocci V, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone: induction of interferon on human leucocytes. *Haematologica*. 1990; 75(6): 510-5.

30. Zimran A, Wasser G, Forman L, Gelbart T, Beutler E. Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. *Acta Haematol.* 2000; 102(3): 148-51.
31. Bhalla DK, Gupta SK, Reinhart PG. Alteration of epithelial integrity, alkaline phosphatase activity, and fibronectin expression in lungs of rats exposed to ozone. *J Toxicol Environ Health A.* 1999; 57(5):329-43.
32. Institute of Laboratory Animals Resources. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC, USA: National Academy Press, 1996.
33. Arruda MJC de; Poggetti RS, Fontes B, Lima WT de, Trezena AG, Birolini D. - Intestinal ischemia/ reperfusion provokes bronchial hyperreactivity and increases serum TNF- α . *Clinics.* 2006; 61(1):21-8
34. Nakagawa, NK, Jukemura J, Aikawa P, Nogueira RA, Poli-de-Figueredo IF, Sannomiya P. In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical sepsis source control. *Clinics.* 2007; 62: 321-6.
35. Lee DK, Terrazas RG, Votto LG, Arenson-Pandikow H. Techniques of inhalatory induction in rats: a comparative study. *Acta Cir Bras.* 1994; 9 (1): 34-7

36. Martins JO, Zanoni FL, Martins DO, Coimbra R, Krieger JE, Jancar S, Sannomiya P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nf-kb activation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Shock*. 2009;31: 404-9.
37. Capelozzi VL, Saldiva PH, Antonângelo L, de Carvalho TS, Logulo A, de Carvalho CR et al. Quantitation in inflammatory pleural disease to distinguish tuberculous and paramalignant from chronic non-specific pleuritis. *J Clin Pathol*.1997;50:935-40.
38. Dallal MM, Chang SW. Evans blue dye in the assessment of permeability surface área product in perfused rat lungs. *J Appl Physiol*. 1994; 77:1030-5.
39. Moraes LB, Murakami AH, Fontes B, Poggetti RS, Van Roojen N, Younes RN, Heimbecker AM, Birolini D. Gut ischemia/reperfusion induced acute lung injury is an alveolar macrophage dependent event. *J Trauma Inj Inf Crit Care*. 2008 ;64:1196-200.
40. Urruchi IW. Tecnologia de ozônio e suas aplicações. Instituto de Ciências Aplicadas do Vale do Paraíba [pesquisa online]. 2007. Disponível em: http://www.icavp.com.br/publicacoes/tecnologia_aplica%E7%F5es.pdf

41. Shibata F, Kato H, Konishi K, Okumura A, Ochiai H, Katsuhisa N et al. Differential changes in the concentrations of cytokine –induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 and CINC-2 in exudate during rat lipolysccharide-induced inflammation. *Cytokine*. 1996; 8(3): 222-6.

42. Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM. The role of interleukin-8 in the infectious process. *Ann N Y Acad Sci*.1994; 730: 134-43.

43. Margalit M , Attias E , Attias D, Elstein D , Zimran A, Matzner Y. Effect of ozone on neutrophil function *in vitro*. *Clin Lab Haematol*.2002; 23(4):243-7.

44. Focà A, Berlinghieri MC, Barreca GS, Placanica PM, Diana R, Liberto MC, Matera G. Kinetics of IL-8, MIP-1 alpha, TNF alpha, IL-1 beta, IL-1ra and IL-10 in human whole blood samples triggered by smooth and rough LPS. *New Microbiol*. 1998; 21 (2): 123-30.

45. Nilsberth C, Elander L, Hamzic N, Norell M, Lönn J, Engström L et al. The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced fever by mechanisms independent of prostaglandin E2. *Endocrinology*.2009;150(4):1850-60.

46. Niu KC, Huang WT, Lin MT, Huang KF. Hyperbaric oxygen causes both antiinflammation and antipyresis in rabbits. *Eur J Pharmacol*. 2009;606(1-3):240-5.

47. Seghaye MC, Duchateau J, Bruniaux J, Demontoux S, Bosson C, Serraf A et al. Interleukin-10 release related to cardiopulmonary bypass in infants undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111:545-53.
48. Kato T, Murata A, Ishida H, Toda H, Tanaka N, Hayashida H et al. Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39(6):1336-40.
49. van der Poll T, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD, Nguyen L, Goldman M, Moldawer LL, Lowry SF. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol*. 1995; 155(11):5397-401.
50. Sewnath ME, Olszyna DP, Birjmohun R, ten Kate FJ, Gouma DJ, van Der Poll T. IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mortality during *Escherichia coli* peritonitis despite an accelerated bacterial clearance. *J Immunol*. 2001; 166(10):6323-31.
51. Menezes SLS, Bozza PT, Faria Neto HCC, Laranjeira AP, Negri EM, Capelozzi VL et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses *J Appl Physiol*. 2005; 98: 1777-83.

52. Laskin DL, Sunil V, Guo Y, Heck DE, Laskin JD. Increased Nitric Oxide Synthase in the Lung after Ozone Inhalation Is Associated with Activation of NF- κ B. *Environ Health Perspect Suppl.* 1998; 106 (S5):1175-9.
53. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: Revisão. 2002. *Acta Cir Bras*;17: 417-23.

APÊNDICES

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/04/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0138/08**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DA SEPSE POR PERITONITE INFECCIOSA EXPERIMENTAL"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "C").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Belchor Fontes**

Pesquisador (a) Executante: **Yglésio Luciano Moyses Silva de Souza**

CAPPesq, 25 de Abril de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Cópia da submissão do artigo derivado desta tese para a revista Clinics

ScholarOne Manuscripts

Página 1 de 1

CLINICS

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Yglesio de Souza

Submission Confirmation

Thank you for submitting your revised manuscript to *Clinics*.

Manuscript ID: CLINICS-Aug-2009-OA-0221.R1

Title: EVALUATION OF THE EFFECTS OF OZONE THERAPY IN THE TREATMENT OF INTRA-ABDOMINAL INFECTION IN RATS

Authors: de Souza, Yglesio
Fontes, Belchor
Martins, Joilson
Sannomiya, Paulina
Brito, Glacus
Younes, Riad

Date Submitted: 11-Oct-2009

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)