



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO
PROCESSOS INTERATIVOS DE ÓRGÃOS E SISTEMAS

KELVIN BORGES ROCHA DE SOUZA

**EFEITOS DA OZONIOTERAPIA EM MASSETER DE RATO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOR INFLAMATÓRIA**

Salvador
2021

KELVIN BORGES ROCHA DE SOUZA

**EFEITOS DA OZONIOTERAPIA EM MASSETER DE RATO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOR INFLAMATÓRIA**

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.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Cajazeira Aguiar

Coorientadora: Prof. Dr^a Luciana Lyra Casais e Silva

Salvador
2021

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Souza, Kelvin Borges Rocha de
Efeitos da ozonioterapia em masseter de rato em modelo experimental de dor inflamatória./ [Manuscrito]. Kelvin Borges Rocha de Souza. Salvador, 2021.

53f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Cajazeira Aguiar.

Coorientadora: Prof. Dra. Luciana Lyra Casais e Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2021.

1. Ozônio. 2. Nocicepção. 3. Síndromes da dor myofascial. I. Aguiar, Marcio Cajazeira. II. Silva, Luciana Lyra Casais e. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título

CDD – 619 21. ed.

KELVIN BORGES ROCHA DE SOUZA

**EFEITOS DA OZONIOTERAPIA EM MASSETER DE RATO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOR INFLAMATÓRIA**

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

Aprovada em, 16 de dezembro de 2021.

Banca Examinadora

Marcio Cajazeira Aguiar, Orientador _____

Doutor em Biologia Celular e Tecidual, pela Universidade de São Paulo.
Universidade Federal da Bahia

Gabriela Botelho Martins _____

Doutora em Odontologia (Estomatologia Clínica), pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Universidade Federal da Bahia

Letícia de Souza Castro Filice _____

Doutora em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela Universidade Federal de Uberlândia
Universidade Federal de Uberlândia

Aos
Mestres que me incentivaram trilhar nesta estrada
o prazer de ter sido educado a exercer a profissão com excelência.

AGRADECIMENTOS

No fim de mais uma jornada, fica o meu agradecimento em primeiro lugar a Deus, como único e suficiente autor da estrada percorrida durante toda a trajetória.

Aos meus pais, Adailton Francisco e Joseane Borges, que em mim depositaram amor e confiança, sempre estiveram do meu lado, incentivando e cuidando, nos mínimos detalhes, de todas as coisas, e que apesar das dificuldades sempre me fortaleceram.

As minhas irmãs, Kelane Borges e Isabela Borges, minha gratidão, pelo apoio e pela cumplicidade que nunca faltaram.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Marcio Cajazeira Aguiar, pelo tempo dedicado, pelos incentivos, correções e correções deste estudo, pelas lições e pelos ensinamentos os quais ultrapassaram minhas limitações, meus eternos reconhecimentos e gratidão.

À minha coorientadora, Professora Luciana Lyra, por todo conhecimento e pela disponibilidade no desenvolvimento deste trabalho, fica minha gratidão.

A todos que participaram da pesquisa: Lysi Guerra, que esteve em todas as etapas de maneira incansável, e a técnica do laboratório de biologia tecidual, Aline Santos.

Não poderia deixar de agradecer ao professor Euclides que, de maneira muito generosa, forneceu os animais e o material necessário durante todo tratamento.

A duas incentivadoras de todo trajeto percorrido antes e durante o mestrado, Ana Carla Barleta e Simone Tosta.

A João Lucas, por toda paciência, incentivo, cuidado e palavras de apoio durante os dois anos de curso.

A todos os colegas, pela a união da turma, fator decisivo em todo caminhada durante o curso.

Aos professores do Programa que, ao longo dos dois anos, passaram muitos ensinamentos e experiências, elevando o nível da pós-graduação.

À coordenação do Programa, no nome dos Professores Ana Caline Nóbrega da Costa e Eduardo Pondé de Sena, pelo trabalho realizado

À Secretaria do Programa, cujos funcionários de maneira atenciosa e responsável desenvolvem seu papel de forma exitosa.

Ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, da Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade de estudar em uma instituição com excelente conceito em educação no país.

“Quem não sabe o que busca, não identifica o que acha”.
“Todo conhecimento humano começou com intuições, passou daí aos conceitos e terminou
com ideias”.

Immanuel Kant

SOUZA, Kelvin Borges Rocha de. **Efeitos da ozonioterapia em masseter de rato em modelo experimental de dor inflamatória**. 2021. Orientador: Prof. Dr. Marcio Cajazeira Aguiar. 53 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021

RESUMO

Introdução: O efeito antinociceptivo do ozônio tem sido descrito na literatura e pode estar relacionado com o aumento do sistema de defesa antioxidante endógeno, com impactos sobre o metabolismo celular e a oxigenação tecidual. Contudo, o efeito desta terapia minimamente invasiva no tratamento de dores miofasciais permanece controverso, especialmente naquelas dores relacionadas com a disfunção temporomandibular. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da ozonioterapia sobre a nocicepção, o processo inflamatório e o reparo tecidual no músculo masseter de ratos, em um modelo de inflamação induzida pela carragenina. **Materiais e Métodos:** O processo inflamatório foi induzido pela administração de carragenina lambda na solução a 2% de 100 µL, no masseter direito dos ratos, e para o limiar nociceptivo avaliado utilizou-se o analgesímetro digital para o teste de von Frey, nos tempos de 5 horas, 1, 3 e 7 dias após sua administração. O grupo controle recebeu salina nas mesmas condições. Para avaliar o efeito da ozonioterapia sobre a nocicepção causada pela carragenina, os ratos foram tratados com ozônio na dose de 0,0016 mg/Kg, em um volume de 0,01ml logo após administração da carragenina ou salina (O3+Car e O3+Sal). Ibuprofeno na dose de 14mg/Kg foi usado como controle positivo (Ibup+Car e Ibup+Sal). Decorridos 1 e 8 dias após a administração da carragenina ou salina, os animais foram eutanasiados e os masseteres processados para análise histológica semiquantitativa. **Resultados:** O estudo antinociceptivo mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Sal e Car nos períodos de 5h, 1d, 3d e 7d, entre os grupos Ca e Ibup+Car em 1d, 3d e 7 d e entre os grupos Sal e O3-Sal em 5h e 7d. Não houve diferença na variação do limiar nociceptivo entre os grupos Car e O3+Car. Um dia pós a carragenina, a avaliação histológica do grupo Car mostrou hemorragia, edema e um infiltrado inflamatório agudo ocupando áreas de intensa destruição tecidual, que eram discretamente mais severas no grupo O3+Car. No período de 8 dias, os grupos Car e O3+Car compartilhavam os mesmos achados histológicos, ou seja, infiltrado inflamatório crônico com alguns linfócitos, muitos macrófagos e raros mastócitos associados a um severo dano tecidual. Distintamente dos grupos Sal e Ibup+Sal, o grupo O3+Sal mostrou um infiltrado inflamatório crônico discreto que preenchia pequenas áreas de destruição tecidual. Alguns neutrófilos foram observados nas proximidades de fibras musculares em regeneração nos grupos submetidos à ozonioterapia. **Conclusão:** A ozonioterapia pela via intramuscular não foi capaz de diminuir a nocicepção, necrose e degeneração muscular, inflamação e edema induzidos pela carragenina no músculo masseter, mas se mostrou potencialmente capaz de estimular o reparo em injúrias teciduais de origem inflamatória por uma via relacionada com os neutrófilos.

Palavras-chave: Ozônio. Nocicepção. Síndromes da dor miofascial.

SOUZA, Kelvin Borges Rocha de. **Effects of ozone therapy on rat masseter in an experimental model of inflammatory pain.** 2021. Advisor: Prof. Dr. Marcio Cajazeira Aguiar. 53 s. ill. Dissertation (Master in Interactive Processes of Organs and Systems) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2021

ABSTRACT

Introduction: The antinociceptive effect of ozone (O₃) has been described in the literature and may be related to the increase in the endogenous antioxidant defense system, with impacts on cellular metabolism and tissue oxygenation. However, the effect of this minimally invasive therapy in the treatment of myofascial pain remains controversial, especially in those pains related to temporomandibular disorders. **Objective:** To evaluate the effects of ozone therapy on nociception, the inflammatory process and tissue repair in the masseter muscle of rats in a model of inflammation induced by carrageenan. **Material e Methods:** The inflammatory process was induced through the administration of lambda carrageenan in a 2% solution of 100 µL, in the right masseter of the rats, and the nociceptive threshold was evaluated using the digital analgesimeter for the von Frey test at 5 hours, 1, 3 hours and 7 days after its administration. The control group received saline under the same conditions. To evaluate the effect of ozone therapy (O₃) on the nociception caused by carrageenan, the rats were treated with O₃ at a dose of 0.0016 mg/kg in a volume of 0.01 ml immediately after administration of carrageenan or saline (O₃+Car and O₃+Sal). Ibuprofen at a dose of 14mg/kg was used as a positive control (Ibup+Car and Ibup+Sal). One and 8 days after the administration of carrageenan or saline, the animals were euthanized and the masseters processed for semiquantitative histological analysis. **Results:** The antinociceptive study showed statistically significant differences between the Sal and Car groups at 5h, 1d, 3d and 7d, between the Ca and Ibup+Car groups at 1d, 3d and 7, and between the Sal and O₃-Sal groups at 5h and 7d. There was no difference in the nociceptive threshold variation between the Car and O₃+Car groups. One day after carrageenan, histological evaluation of the Car group showed hemorrhage, edema and an acute inflammatory infiltrate occupying areas of intense tissue destruction, which were slightly more severe in the O₃+Car group. In the period of 8 days, the Car and O₃+Car groups shared the same histological findings, that is, chronic inflammatory infiltrate with some lymphocytes, many macrophages and rare mast cells associated with severe tissue damage. Unlike the Sal and Ibup+Sal groups, the O₃+Sal group showed a mild chronic inflammatory infiltrate that filled small areas of tissue destruction. Some neutrophils were observed in the vicinity of regenerating muscle fibers in the groups submitted to ozone therapy. **Conclusion:** Intramuscular ozone therapy was not able to reduce nociception, muscle necrosis and degeneration, inflammation and edema induced by carrageenan in the masseter muscle, but it was potentially capable of stimulating repair in tissue injuries of inflammatory origin through a neutrophil-related pathway.

Keywords: Ozone; Nociception; Myofascial Pain Syndromes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Linha experimental.....27
- Figura 2** - Gerador de ozônio Philozon Medplus MX e Medplus MX Maleta® (A). Aplicação da carragenina no masseter direito do rato (B). Teste de von Frey realizado com uso do analgesímetro digital (C).....28
- Figura 3** - Efeito da administração da carragenina (Car) (A) e do tratamento dos animais com ibuprofeno (dose de 14 mg/ Kg) (B) sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica, mensurado com analgesímetro digital.....33
- Figura 4** - Efeito do tratamento com ozônio nos animais inoculados com carragenina sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica, mensurado com analgesímetro digital - von Frey.....34
- Figura 5** - Fotomicrografias mostrando secções transversais das fibras musculares do músculo masseter dos grupos tratados com carragenina.....37
- Figura 6** - Fotomicrografias mostrando secções transversais das fibras musculares do músculo masseter dos grupos Sal, Car, Ibup+Car e O3-Car, no tempo experimental de 1 dia.....38
- Figura 7** - Fotomicrografias mostrando secções transversais das fibras musculares do músculo masseter dos grupos Car, Ibup+Car e O3-Car, no tempo experimental de 8 dias.....39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Distribuição dos animais nos dois tempos experimentais de acordo com os grupos	27
Quadro 2	CrITÉrios semiquantitativos empregados na análise histológica	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórias não Esteroides
ATM	Articulação Temporomandibular
Car	Carragenina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX	Ciclooxigenase
DTM	Disfunção Temporomandibular
Hb	Hemoglobina
Hb O ₂	Óxido de hemoglobina
IASP	Associação Internacional do Estudo da Dor
Ibup+Car	Ibuprofeno + Carragenina
Ibup+Sal	Ibuprofeno + Soro fisiológico
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
O ₃ +Car	Ozônio + Carragenina
O ₃ +Sal	Ozônio+ Soro fisiológico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
RNS	Espécie reativas de nitrogênio
ROS	Espécie reativas de oxigênio
Sal	Soro fisiológico
SDM	Síndrome da Dor Miofascial
TGF β	Fator de crescimento transformante beta
UFBA	Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
4 REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1 DOR	19
4.2 DOR MIOFASCIAL	19
4.3 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOR MIOFASCIAL	20
4.4 ETIOLOGIA	20
4.5 FISIOPATOLOGIA	21
4.6 TRATAMENTOS DA DOR MIOFASCIAL.....	21
4.7 OZÔNIO	22
4.8 PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO OZÔNIO	22
4.9 OZONIOTERAPIA.....	23
4.10 MODO DE AÇÃO DA OZONIOTERAPIA	23
4.11 APLICAÇÃO DA OZONIOTERAPIA NA MEDICINA	24
4.12 APLICAÇÃO DA OZONIOTERAPIA NA ODONTOLOGIA	25
5 METODOLOGIA	26
5.1 ANIMAIS.....	26
5.2 DROGAS	26
5.3 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO	28
5.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA (HIPERALGESIA MUSCULAR)....	28
5.5 PREPARAÇÃO TECIDUAL	29
5.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	30
5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	30
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
6 RESULTADOS	32
6.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA.....	32
6.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	33
7 DISCUSSÃO	39
8 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

A dor é uma queixa comum nos consultórios médicos, odontológicos e de fisioterapia, incluindo a região orofacial. Apesar dos avanços recentes na compreensão, diagnóstico e tratamento, a dor, especialmente a dor crônica, ainda permanece um problema de saúde pública. Uma condição dolorosa comum é a dor miofascial, especialmente nos músculos mastigatórios. Nos músculos mastigatórios, a dor miofascial geralmente está relacionada a uma condição de cunho inflamatório, denominada de Síndrome da Dor Miofascial (SDM). Pode estar relacionada com algum tipo de disfunção temporomandibular (DTM), bruxismo, apertamento dentário, hábitos parafuncionais, estresse e distúrbios nutricionais.^{1,2,3} Apresenta uma prevalência aproximada 10 a 20% na população e é duas vezes mais frequente nas mulheres.⁴

A SDM é uma condição clínica específica de dor muscular regional, muitas vezes associada à presença de um ou mais pontos dolorosos, chamados de pontos-gatilho. O aumento da tensão muscular, diminuição do pH local e redução do fluxo sanguíneo e da oxigenação causam injúria muscular, que estimula a produção e liberação de mediadores químicos inflamatórios, relacionados com a sensibilização de nociceptores e com o aparecimento da dor. Em geral, isso resulta em pacientes que sofrem de sensibilidade local, dor referida, cefaleia, rigidez e limitação dos movimentos musculares.⁵ O tratamento dessa condição visa ao alívio da dor e à correção dos fatores precipitantes. Dentre as opções de tratamento, podem-se destacar as placas miorelaxantes, laserterapia, fisioterapia, estimulação nervosa elétrica transcutânea, relaxantes musculares, drogas anti-inflamatórias e analgésicos.²

Uma opção para o tratamento de dor nos músculos mastigatórios seria a ozonioterapia. O ozônio é um gás natural encontrado na atmosfera ou produzido por meio de geradores, constituindo-se em um potente agente oxidante para fins terapêuticos. Ele tem sido utilizado em muitas doenças, como câncer, sequelas produzidas pelo vírus da imunodeficiência humana e artrite reumatoide, além de ser empregado na eliminação de vírus, bactérias e fungos.^{6,7,8} De caráter pouco invasivo, a ozonioterapia pode ser uma importante opção para o tratamento na dor miofascial, em virtude dos possíveis efeitos sobre o metabolismo celular, a oxigenação tecidual e a regulação da inflamação, a partir da ação antioxidante, removendo radicais livres, agindo como um protetor de células saudáveis, com impacto sobre a nocicepção do tecido injuriado. Os poucos estudos sobre as suas propriedades antinociceptivas foram realizados em humanos e apontam para um resultado favorável nos grupos tratados pela ozonioterapia.^{3,9} Entretanto, ainda que se observe um efeito importante da ozonioterapia no tratamento da dor

miofascial, tem sido comum constatar uma melhora nos grupos tratado com placebo (substância ou tratamento sem efeito) em humanos.²

Alguns parâmetros de nocicepção podem ser estudados em modelos animais, cujos mecanismos fisiológicos sejam razoavelmente análogos àqueles de uma doença humana. Um modelo experimental capaz de reproduzir uma mialgia é a hiperalgesia muscular induzida pela carragenina. A carragenina, substância extraída de algas marinhas, produz uma resposta inflamatória aguda inicial, que aumenta a sensibilidade térmica e mecânica por estimular a liberação de substâncias pró-inflamatórias, como a bradicinina e histamina, dentre outros, com recrutamento de neutrófilos e macrófagos. A estratégia de aplicar a carragenina na articulação femorotibial e no músculo gastrocnêmico de roedores tem sido empregada como modelo para estudar a inflamação aguda nas primeiras 24 horas e de inflamação crônica após 1 semana.¹⁰

A sensibilidade mecânica produzida pela carragenina e o efeito de terapias sobre este modelo podem ser mensurados pelo teste de von Frey. Trata-se de um método muito utilizado na clínica que avalia a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico.¹¹ Tradicionalmente empregado para avaliar a eficácia de drogas sobre a inflamação induzida nas patas de roedores, o presente estudo propôs avaliar o efeito de drogas ou terapia sobre o músculo masseter.

O músculo masseter é o principal e maior músculo da mastigação, sendo responsável por receber elevada carga de força e tensão durante os movimentos mandibulares.¹² Modificações da articulação temporomandibular (ATM) por traumas ou doenças degenerativas, hábitos parafuncionais ou deficiência de aporte nutricional podem gerar uma sobrecarga ao músculo, gerando quadros inflamatórios agudos ou crônicos, responsáveis por quadros algícos nesse músculo.^{10,13}

Os poucos trabalhos em humanos e disponíveis na literatura têm testado os efeitos da ozonioterapia sobre a dor miofascial pela aplicação intramuscular de misturas de oxigênio e ozônio no músculo masseter de pacientes com distúrbios temporomandibulares.^{3,14} Apesar desses trabalhos mostrarem um efeito antinociceptivo aparentemente positivo da ozonioterapia, não existem estudos mostrando o impacto biológico dessa terapia sobre a estrutura tecidual dos músculos da mastigação.

Em estudo anterior, o modelo experimental de hiperalgesia em masseter de ratos, induzida pela carragenina, foi utilizado para avaliar os efeitos da toxina botulínica sobre a dor miofascial, cujos achados indicaram uma redução na hiperalgesia no músculo masseter de ratos, porém, sem efeito sobre o edema inflamatório e sobre o dano tecidual induzido pela droga carragenina.¹⁵ No presente trabalho, tendo em vista o crescente interesse pela utilização da ozonioterapia na Odontologia, o presente estudo investigou os efeitos dessa terapia em músculo masseter de ratos, em um modelo experimental de inflamação induzida pela carragenina.

2 JUSTIFICATIVA

A ozonioterapia tem se tornado uma opção terapêutica em Medicina, Odontologia e Fisioterapia, especialmente por tratar-se de uma terapia de baixo custo, pouco invasiva e acessível. Assim, o aprofundamento científico dos efeitos benéficos da ozonioterapia é relevante para promoção da saúde da população que procura nesses serviços, especialmente na indicação adequada, maior eficácia dessa terapia e na prevenção de possíveis efeitos colaterais. Contudo, ainda que a sua atividade antimicrobiana e o seu potencial tóxico ao ser inalado estejam bem estabelecidos na literatura^{16,17,18}, há uma grande lacuna no conhecimento dos seus efeitos terapêuticos sobre o reparo tecidual, inflamação e nocicepção, especialmente com relação às vias celulares e moleculares envolvidas nesses processos. Há alguns trabalhos mostrando um efeito antinociceptivo da ozonioterapia sobre as dores miofasciais, mas a compreensão biológica dos seus mecanismos de ação é limitada, uma vez que são estudos clínicos realizados em humanos^{2,14}.

O modelo experimental de inflamação induzida pela carragenina em patas de roedores é um modelo reproduzível e muito empregado em testes de eficácia de analgésicos e anti-inflamatórios¹³. No presente trabalho, tivemos a ideia de reproduzi-lo em um dos músculos da mastigação mais comumente acometidos por dores miofasciais, o músculo masseter.

Diante desse panorama, com o objetivo de investigar o efeito da ozonioterapia sobre a nocicepção e sobre a tecido muscular lesionado, o presente trabalho avaliou os efeitos dessa terapia em um modelo experimental de dor infamatória em ratos, por meio de teste de avaliação do limiar nociceptivo (teste de von Frey) e de estudo de cortes histológicos por microscopia de luz.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da ozonioterapia sobre a nocicepção e o reparo tecidual no músculo masseter de ratos em um modelo de inflamação induzida pela carragenina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antinociceptivo da ozonioterapia por meio do teste de avaliação do limiar nociceptivo (teste de von Frey) em masseteres de ratos infiltrados com carragenina;
- Analisar o processo inflamatório e o reparo teciduais em masseteres de ratos infiltrados com carragenina e submetidos à ozonioterapia, por meio da análise histológica em microscopia de luz.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 DOR

A Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como uma experiência sensitiva ou emocional desagradável, ligada a um dano tecidual, potencial ou já pré-existente, podendo ser caracterizada, de acordo com a intensidade e duração, em dor aguda ou crônica. A dor atua como um mecanismo de proteção pelo qual o corpo reage contra uma agressão que, por sua vez, responde, afastando-se da fonte de estímulo doloroso. Quando a dor persiste por tempos prologados, o seu significado biológico é perdido.^{19,20}

A dor é uma experiência única e individual, pois fatores subjetivos (emocionais, cognitivos e afetivos) podem interferir na sua percepção. Diante disso, o termo dor e nocicepção têm significados diferentes. A dor envolve a agressão de determinada região por um estímulo térmico, mecânico ou químico, cuja intensidade é modulada por fatores subjetivos, enquanto a nocicepção compreende os processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais, gerados em resposta à um estímulo nocivo externo.^{21,22}

A dor aguda, quando presente, tem o potencial de alterar a fisiologia corporal, influenciando a produção de hormônios, como a secreção de corticosterona, elevando a pressão arterial, ativando o sistema nervoso simpático e aumentando a frequência cardíaca. Distintamente da dor aguda, a dor crônica é mais duradoura, apresentando uma duração superior a três meses. Pode ser a consequência de uma doença pré-existente ou não apresentar causa reconhecível, consistindo, muitas vezes, na própria doença. A dor crônica pode impactar negativamente na vida dos portadores, comprometendo física, psíquica e socialmente o indivíduo.²³ Uma condição de dor crônica muito comum na clínica e que afeta o sistema musculoesquelético é a dor miofascial.²⁴

4.2 DOR MIOFASCIAL

A Síndrome da Dor Miofascial (SDM), também conhecida como síndrome dolorosa miofascial, é associada à presença de pontos gatilhos, nódulos focais e muito sensíveis, localizados na porção mais tensa do músculo afetado. São dolorosos à palpação, estando, muitas vezes, acompanhados de espasmo muscular, limitação de movimento e fraqueza muscular. Caracteriza-se por uma dor percebida não apenas no local de origem, mas também a distância, sendo clinicamente

descrita pelo paciente como uma dor irradiada que pode afetar a cabeça e pescoço, onde os músculos mais afetados são os da mastigação, sendo o principal e maior músculo o masseter.^{1,23,25}

4.3 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOR MIOFASCIAL

Dados epidemiológicos indicam que aproximadamente 85% da população mundial queixa de dor miofascial em algum momento da vida, podendo ser de origem crônica ou aguda. A SDM é a principal causa de dor musculoesquelético e acomete preferencialmente indivíduos na faixa etária entre 30 e 60 anos, sendo mais prevalente em mulheres (cerca de 65% dos casos).²⁶

Fishbain e colaboradores (1986) e Friction (1990) observaram, em estudo clínico com 164 pacientes, que a dor miofascial é a origem de 85% das lombalgias e 54,6% das cefaleias e das dores da região cervical, enquanto que Schiffman e colaboradores (1990) demonstraram que 50% da população americana é portadora da dor miofascial nos músculos mastigatórios.^{27,28,29}

Constitui-se em um sério problema de saúde pública, visto que pode agir como uma porta de entrada para outros quadros sintomáticos, afetando a qualidade do sono do paciente e estimulando o aparecimento de distúrbios psicológicos, dentre eles, a ansiedade e a depressão.^{1,25,27,28,29,30}

4.4 ETIOLOGIA

A etiologia da dor miofascial é multifatorial e pode estar relacionada ao desequilíbrio postural, hábitos parafuncionais, traumas locais, estresse, distúrbios do sono e alterações nutricionais, sendo uma queixa comum na clínica odontológica, médica e de fisioterapia. Essa condição está relacionada à presença de pontos dolorosos nos músculos e leva ao encurtamento das fibras musculares, tendões e ligamentos circunvizinhos. Nesses músculos, é percebida a presença de nódulos nas fibras musculares devido ao alongamento e ao estreitamento repetido. Há fadiga, com conseqüente falta do aporte nutricional e de oxigênio no músculo comprometido, além de um esforço excessivo de tais fibras musculares para suprir as taxas metabólicas, que compreendem o nível mínimo de energia para manter as funções do corpo em repouso, as quais, quando não supridas de maneira adequada, podem levar ao quadro de dor miofascial.³⁰

Os pontos gatilho são classificados em primários, secundários, ativos e latentes. Os primários referem-se aos pontos dolorosos intimamente relacionados com a fadiga da fibra muscular, enquanto os pontos gatilho secundários são provenientes de pontos situados nas regiões

com queixa de dor referida. Já os pontos ativos incluem regiões em que há sintomatologia dolorosa espontânea e não precisam de estímulo físico ou térmico para gerar a dor e durante a compressão expõem um nível maior de dor. Já os pontos latentes só apresentam sintomatologia dolorosa silenciosa e não é causa de dor espontânea, a qual necessita de um estímulo como pressão ou palpação da região, o que pode gerar espasmo no local, fraqueza muscular e diminuição da flexibilidade.¹

O processo de desenvolvimento da dor miofascial está relacionado com os fatores que modulam ou perpetuam essa alteração neuromuscular, em que se destacam os mecânicos que envolvem as mais diversas disfunções temporomandibulares, como estresse, bruxismo e apertamento dentário; o estresse compreende diversos problemas que podem resultar em dor e desconforto na articulação temporomandibular (ATM) e nas estruturas circunvizinhas (região periauricular e músculos mastigatórios), com possíveis impactos na audição, na fala e na mastigação, e ainda com limitação dos movimentos mandibulares. Aproximadamente 25% da população mundial apresenta algum distúrbio da ATM, com cerca de 65% desses pacientes relatando dor associada a esse distúrbio. Outros fatores relacionados ao desenvolvimento da dor miofascial são os não mecânicos, que envolvem processos infecciosos, desequilíbrio imunológicos, hormonal e psicológico.^{31,32}

4.5 FISIOPATOLOGIA

Parece haver uma correlação entre a dor miofascial e a liberação exacerbada da acetilcolina, neurotransmissor produzido no sistema nervoso central e periférico, relacionado com a transmissão do estímulo da fibra nervosa para a célula muscular estriada esquelética. As células musculares, quando estimuladas com maior frequência, podem tornar-se sobrecarregadas, havendo um desgaste das fibras musculares, o que resulta em anomalias nas placas motoras relacionadas, geradas pela liberação anormal de acetilcolina. Além disso, as sucessivas contrações musculares e encurtamentos dos sarcômeros acarretam a compressão dos vasos sanguíneos, com diminuição do aporte de nutrientes e de oxigênio aos músculos e com liberação de substâncias neuroativas que perpetuam a mialgia.^{1,33}

4.6 TRATAMENTOS DA DOR MIOFASCIAL

O tratamento da dor muscular é um desafio na prática clínica, estando relacionado com a extensão do dano muscular e com a duração e severidade dos sintomas. O tratamento dessa dor requer primordialmente um diagnóstico correto para que haja eficácia no tratamento, visto que a

sintomatologia da síndrome, quando irradiada, pode ser confundida com diversas condições de etiologia distinta, sendo necessário agir diretamente nos fatores desencadeantes. Existem diversas opções de tratamento reversíveis e irreversíveis para tratar a condição associada aos músculos da mastigação, mas nos casos em que o fator causal é uma desordem funcional, quando o paciente relata sintomas físicos, o tratamento de eleição pode ser a placa mio-relaxantes, laserterapia, fisioterapia, estimulação nervosa elétrica transcutânea e drogas, como relaxantes musculares, anti-inflamatórios e analgésicos. Os tratamentos mais invasivos, como cirurgias, estão indicados para as síndromes dolorosas relacionadas com uma alteração estrutural severa da ATM.^{1,2,25}

Uma boa opção para tratamento da dor miofascial orofacial seria a ozonioterapia, em virtude dos seus possíveis efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório e do seu potencial para aumentar a oxigenação tecidual e estimular a ativação do sistema imunológica.^{34,35}

4.7 OZÔNIO

Uma opção conservadora para a atenuação de dor nos músculos mastigatórios seria a ozonioterapia. O ozônio é um gás natural que pode ser encontrado na atmosfera ou produzido por meio de geradores, através da mistura de O_2 e O_3 ; além da forma de gás, pode apresentar-se associado à água ou ao óleo.¹ O oxigênio é um átomo simples que tende a formar uma molécula muito estável denominada de O_2 . Quando a eletricidade ou a luz ultravioleta é aplicada sobre uma molécula de O_2 , os dois átomos de oxigênio são separados em átomos únicos que rapidamente tenderão a formar um par, recuperando a forma de uma molécula de O_2 . Mas uma pequena porcentagem desses átomos se unirá para formar uma molécula formada por três átomos de oxigênio conhecida como ozônio. O ozônio (O_3), assim, é uma molécula composta por átomos de oxigênio, todos compartilhando os mesmos elétrons. Como não há elétrons suficientes para serem compartilhados pelos três átomos de oxigênio, o ozônio é uma molécula relativamente instável. Essa aparente instabilidade seria o motivo pelo qual o ozônio é considerado um estimulante biológico poderoso.³⁶

4.8 PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO OZÔNIO

O O_3 é um gás instável que tem em sua molécula 18 elétrons, que formam um sistema ressoante estável em diferentes estados. O gás do ozônio assume um estado gasoso em temperatura ambiente e apresenta-se de forma incolor com um cheiro característico, enquanto a sua forma

líquida exibe uma cor azul escura, quando realizada a solubilidade parcial em água. Devido a sua instabilidade, quando ele passa por uma liberação de calor, é rapidamente transformado em oxigênio.³⁷

Do ponto de vista biológico, o O₃ é um potente elemento antimicrobiano, atuando como fungicida, bactericida e virucida. Outra propriedade está relacionada com ativação do sistema imunológico por meio da melhora da atividade do fluxo sanguíneo, uma vez que ele estimula o metabolismo celular, a partir dos hidroperóxidos produzidos pelos agentes da ozonólise, sendo considerado um agente terapêutico seletivo, quando usado em baixas concentrações; ademais, ele tem propriedades antioxidantes, uma vez que evita o acúmulo de radicais livres, moléculas essas liberadas durante esse metabolismo, com elétrons altamente instáveis e reativos, que podem causar injúria e morte celular.³⁴

4.9 OZONIOTERAPIA

A ozonioterapia se constitui em uma modalidade de tratamento menos invasiva e mais confortável do que alguns tratamentos convencionais. Embora o O₃ seja conhecido por sua ação destrutiva contra bactérias, fungos e vírus, sua ação antioxidante parece ser a mais importante para o tratamento médico, uma vez que atua na proteção de células saudáveis do organismo liberando radicais livres.³⁸

Adicionalmente, tem sido descrita a sua capacidade de estimular a oxigenação tecidual pela vasodilatação e por promover a angiogênese, além de possíveis efeitos antinociceptivos relacionados ao controle da inflamação local.³⁵ Também alguns estudos têm mostrado que o ozônio estimula o reparo dos tecidos musculoesqueléticos por induzir o aumento do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e do fator de crescimento transformante beta (TGF-β), além de aumentar a atividade do fator nuclear Kappa B (NF-κB), importante agente imunomodulador da inflamação.^{39,40}

A ozonioterapia pode ser administrada por inúmeras formas, podendo ser aplicada por auto-hemotransfusão, insuflação retal, vias intramusculares, intradiscal, subcutânea e dermatológica.⁴⁰

4.10 MODO DE AÇÃO DA OZONIOTERAPIA

Os efeitos da ozonioterapia se estabelecem pela interação do gás ozônio com as fibras musculares, promovendo uma ação antioxidante. Tais reações podem ser reativas ao oxigênio, uma vez que estimulam o metabolismo celular, causando melhora da circulação sanguínea e desintoxicação do organismo. Contudo, por se tratar de um oxidante extremamente tóxico, deve-se respeitar a dosagem e a concentração adequadas para que haja eficácia e segurança na sua realização.³⁹

Do ponto de vista médico, apontam-se três mecanismos que explicam a ação terapêutica do ozônio. Um deles envolve a ativação do metabolismo das hemácias e a ativação e indução de antioxidantes biológicos; nestes, as moléculas de ozônio reagem com radicais hidroxil para formar peróxidos de ozônio; na presença do peróxido de ozônio, observa-se uma alteração da proporção de óxido de hemoglobina (HbO₂)/hemoglobina (Hb), uma vez que a diferença de concentração e a instabilidade da oxiemoglobina provocam uma dissociação de oxigênio da hemoglobina usada para respiração celular. O segundo mecanismo de ação é a ativação de enzimas antioxidantes atuando sobre os radicais livres, realizando um efeito protetor sobre tecidos inflamados, por eliminarem radicais livres, enquanto o terceiro mecanismo consistiria na ativação de células imunocompetentes, a fim de reproduzir uma resposta imunitária específica para responder à estimulação antigénica.^{3,9,41}

4. 11 APLICAÇÃO DA OZONIOTERAPIA NA MEDICINA

Na Medicina, a ozonioterapia tem sido utilizada principalmente por meio da insuflação retal e da administração oral e retal de água ozonizada com efeitos significativos sobre as respostas imunológicas intestinais, tendo a capacidade de combater quadros de toxicidade e disfunção, provocados pela ação de microrganismos invasores. Outras vias de administração têm se mostrado eficazes e seguras também e a escolha da via adequada dependerá diretamente da patologia e da região afetada.⁴⁰

Na terapia com ozônio, visando a potencializar sua ação sobre a parede microbiana, o gás pode ser manipulado com outras substâncias como óleo e água. O ozônio associado com óleos vegetais (girassol, azeitona, coco e palmeira) é utilizado para o tratamento de infecções e inflamações de pele. O ozônio associado com água (água ionizada) tem sido utilizado para tratar gastrite, esofagite, úlceras e colicistite crônica. Alguns otorrinolaringologistas tem recomendado a inalação da água ionizada para alguns problemas respiratórios.^{37,41}

4.12 APLICAÇÃO DA OZONIOTERAPIA NA ODONTOLOGIA

A ozonioterapia também tem sido aplicada na área de Odontologia, com resultados bastante promissores em diversas situações clínicas, como terapia coadjuvante para estimular o reparo de enxertos gengivais e ósseos, tratar lesões bucais e atenuar dor pós-operatória em cirurgias dentárias.³ Também tem sido utilizada como descontaminante no tratamento das desordens periodontais e da cárie dentária, na terapia endodôntica e no tratamento da osteomielite, osteorradionecrose e de outros tipos de necroses induzidas por medicamentos.¹⁰

Pelo fato de a ozonioterapia ser minimamente invasiva e apresentar propriedades potencialmente efetivas para atuar sobre os mecanismos fisiopatológicos da dor miofascial, sugere-se que este tratamento pode ser um importante elemento coadjuvante para o tratamento da Síndrome da Dor Miofascial. Contudo, é necessários estudos adicionais, para maior compreensão dos seus efeitos biológicos, especialmente no tratamento das mialgias.^{34,42}

5 METODOLOGIA

5.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, que estabeleceu procedimentos para o uso científico de animais, tendo sido previamente aprovados pela Comissão de Ética e Uso dos Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob registro de nº 5523240320 (Anexo 1).

Foram utilizados no total de 77 ratos, *Ratus norvegicus*, Wistar, machos, com peso corpóreo entre 200 e 250 gramas foram aclimatados por 15 dias no Biotério de Experimentação do Laboratório de Neuro-imunoendocrinologia e Toxinologia do ICS/UFBA, nutridos com ração solida peletizada (Nuvilab CR- 1,20 Kg- Nuvital Agropecuária Ltda.) e hidratados com água à vontade. Os animais foram divididos em três grupos e seis subgrupos, conforme a **Quadro 1**, seguindo a linha experimental da pesquisa (**Figura 1**).

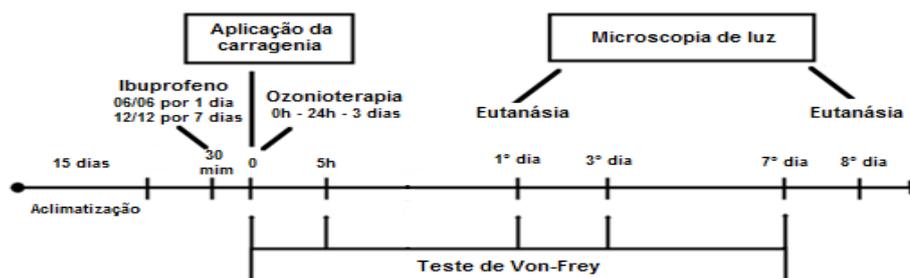
Com base nos princípios norteadores do uso humanitário de animais em pesquisas científicas (Os três Rs), os subgrupos compreendendo os masseteres tratados apenas com solução salina (grupo Sal) nos períodos de 1 e 8 dias foram compostos pelos mesmos animais.³⁴

Quadro 1 - Distribuição dos animais nos dois tempos experimentais de acordo com os grupos.

Período	Controle		Ibuprofeno		Ozonioterapia	
	Salina (Sal)	Carragenina (Car)	Salina (Ibup+Sal)	Carragenina (Ibup+Car)	Salina (O3+Sal)	Carragenina (O3+Car)
1 dia		n= 7	n= 7	n= 7	n= 7	n= 7
8 dias	n= 7	n= 7	n= 7	n= 7	n= 7	n= 7

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 1 - Linha experimental delimitando as drogas e terapias utilizadas (carragenina, ibuprofeno e ozônio) bem como tempo e os testes realizados na pesquisa (teste de von Frey e microscopia de luz).



Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 DROGAS

As substâncias utilizadas no presente estudo foram carragenina e ibuprofeno e o gás ozônio. A carragenina foi utilizada na forma de uma solução a 2% de carragenina lambda (type IV, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

O ozônio foi produzido por um gerador de ozônio Philozon Medplus MX e Medplus MX Maleta® (Philozon®, Santa Catarina, Brasil) (**Figura 2A**), sendo empregado sob a forma de uma mistura gasosa constituída por 5% de ozônio e 95% de oxigênio, com concentração de 20 µg/ml. A concentração de ozônio foi medida usando um espectrofotômetro de UV a 254 nm. A mistura gasosa foi injetada por via intramuscular em cada animal utilizando-se uma dose de 0,0016 mg/Kg em um volume de 0,02ml. Nos animais dos grupos O3+Sal e O3+Car, a ozonioterapia foi realizada em três sessões durante 1 semana, sendo administrada imediatamente após a aplicação da solução salina ou carragenina, 24 horas e 3 dias após a injúria inflamatória.^{2,44}

Figura 2 - Imagens dos procedimentos experimentais. Gerador de ozônio Philozon Medplus MX e Medplus MX Maleta® (**A**). Infiltração da carragenina no músculo masseter direito do rato (**B**). Realização do teste de von Frey por meio de um analgesímetro digital (**C**).



Fonte: Fotos do arquivo do autor.

A droga ibuprofeno foi administrada por via oral na dose de 14mg/Kg e na forma de uma suspensão em gotas, 100mg/ml (Geolab®, Goiás, Brasil), com auxílio de uma ponteira plástica endodôntica acoplada a uma seringa de insulina Ultra-fine™, nos animais dos grupos Ibuf+Sal e Ibuf+Car, sendo empregada 30 minutos antes da aplicação da injúria experimental e no período de 060/6 horas no primeiro dia e de 12/12 horas por mais seis dias após a indução da inflamação.

5.3 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

Uma solução a 2% de 100 µL de carragenina lambda (type IV, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) foi aplicada no músculo masseter dos animais, em um ponto situado inferiormente 10 mm de um ponto localizado no centro de uma linha imaginária traçada entre a órbita e o trágus do animal (**Figura 2B**). Um subgrupo de ratos de cada grupo (Car, Ibuf+Car e O3+Car) recebeu uma solução de carragenina (diluída em solução salina), enquanto os demais subgrupos de ratos (Sal, Ibuf+Sal e O3+Sal) foram tratados com 100 µL de uma solução salina, ambos com uma seringa de insulina Ultra-fine™ acoplada à uma agulha de 0,3 x 13 mm (30G).

5.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA (HIPERALGESIA MUSCULAR)

A técnica de detecção de alterações nas respostas comportamentais nociceptivas dos animais foi adaptada a partir do método para avaliação da alodinia mecânica proposto por Ren (1999).⁴⁵ Os ratos foram habituados a se manterem eretos sobre as patas traseiras sobre uma superfície, sempre encostados à mão do avaliador protegida por uma luva de couro comum.

A mensuração do limiar do reflexo da retirada da cabeça foi executada com analgesímetro digital de Von Frey (modelo EFF 301, Insight) antes da infiltração de carragenina (basal), 5 horas, 1, 3 e 7 dias após a aplicação deste agente inflamatório (**Figura 2C**). Baseado no fato de que as sondas nociceptivas com o diâmetro igual ou maior a 1,6 mm refletem o limite de nocicepção mecânica em tecidos mais profundos, como os músculos,⁴⁶ a ponta metálica rígida do analgesímetro foi revestida por uma capa arredondada (diâmetro de 3 mm), confeccionada previamente com resina acrílica autopolimerizável DuraLay (Reliance Dental MFG. CO.) com objetivo de promover uma pressão muscular efetiva, evitando um estímulo cutâneo.

A ponta foi pressionada gradualmente contra a superfície cutânea da área correspondente ao músculo masseter, perpendicularmente ao plano sagital até o animal ter o reflexo de retirada da cabeça ou emitir um sinal fonético, havendo o registro automático em gramas da maior força

aplicada. O limiar do reflexo de retirada da cabeça de cada animal foi calculado como uma média de cinco medidas realizadas, com um intervalo de 1 minuto entre as mensurações. Para todos os protocolos, o examinador desconheceu o tratamento empregado em cada animal.

As médias de cada grupo e de cada período foram convertidas em percentuais calculados a partir das médias obtidas nos testes de nocicepção coletados no tempo 0, ou seja, antes da administração das drogas testadas e da carragenina (valor basal).

5.5 PREPARAÇÃO TECIDUAL

Decorridos 1 dia (35 ratos) e 8 dias (42 ratos) da infiltração intramuscular da carragenina ou da solução salina, os animais foram eutanasiados com sobredosagem de uma associação de solução a 10% de cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec) e solução a 2% de cloridrato de xilazina (Sedanew®, Vetnil), via intraperitoneal. Após a confirmação da eutanásia, os masseteres foram dissecados de forma a obter a porção posterior do masseter profundo, a qual foi fixada em solução a 4% de formaldeído tamponado em fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, por 24 horas.

5.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após fixação, os espécimes indicados para o estudo em microscopia de luz foram processados e corados para H&E, de forma a obter cortes semi-seriados com 5 µm de espessura e transversais ao longo eixo do músculo masseter.

5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As secções coradas com H&E foram analisadas por um único observador e capturadas com auxílio de um sistema digital de aquisição de imagem contendo microscópio Nikon Eclipse E-200 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) posicionado em objetiva de 40X, acoplado a uma câmera Tucsen TrueChrome Metrics (International Stemmer Imaging, Puchheim, Germany). O software utilizado para captura e análise das imagens foi o TUCSON Tcapture (International Stemmer Imaging, Puchheim, Germany). O estudo morfológico compreendeu a avaliação das fibras musculares esqueléticas e dos demais tecidos associados. Os resultados foram descritos observando a presença e a natureza da inflamação, hemorragia, edema, fibrose, vascularização, alargamento dos espaços

perimisial e endomisial e aspecto das células musculares esqueléticas (núcleo, integridade do sarcoplasma, espessura das fibras e acidofilia). Alguns eventos histológicos foram submetidos a uma análise semiquantitativa adaptada a partir dos trabalhos de Soares e colaboradores (2014) e De Castro e colaboradores (2015), cujos critérios empregados estão descritos na **Tabela 2.**^{47,48}

Quadro 2 – Critérios semiquantitativos empregados na análise histológica.

Critério	Discreto	Moderado	Intenso
Inflamação aguda	Presença de <25% de neutrófilos em relação ao total de células na área observada	Presença de 25 a 50% de neutrófilos em relação ao total de células na área observada	Presença de > 50% de neutrófilos em relação ao total de células na área observada
Inflamação crônica	Presença de <25% de linfócitos em relação ao total de células na área observada	Presença de 25 a 50% de linfócitos em relação ao total de células na área observada	Presença de > 50% de Linfócitos em relação ao total de células na área observada
Hemorragia	Presença de <25% de hemácias extravasculares em relação ao total de células na área observada	Presença de 25 a 50% de hemácias extravasculares em relação ao total de células na área observada	Presença de >50% hemácias extravasculares em relação ao total de células na área observada
Edema	Cerca de <25% dos espaços que separam as miofibras estavam ocupados por material amorfo ou fibrilar, eosinófilo	De 25 a 50% dos espaços que separam as miofibras estavam ocupados por material amorfo ou fibrilar, eosinófilo	Presença de >50% dos espaços que separam as miofibras estavam ocupados por material amorfo ou fibrilar, eosinófilo
Alargamento do espaço endomisial e perimisial	<25% da área observada estava ocupada pelo endomísio e perimísio	Entre 25 a 50% da área observada estava ocupada pelo endomísio e perimísio	>50% da área observada estava ocupada pelo endomísio e perimísio
Necrose e degeneração muscular	<25% da área observada estava ocupada por fibras musculares em degeneração ou necrose	Entre 25% a 50% da área observada estava ocupada por fibras musculares em degeneração ou necrose	> 50% da área observada estava ocupada por fibras musculares em degeneração ou necrose
Fibrose	<25% da área observada estava ocupada por material fibrilar eosinófilo pálido (deposição de colágeno).	Entre 25% a 50% da área observada estava ocupada por material fibrilar eosinófilo pálido (deposição de colágeno).	> 50% da área observada estava ocupada por material fibrilar eosinófilo pálido (deposição de colágeno).

Fonte: Dados da pesquisa.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm) das amostras analisadas. Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste de Anova-Two

Way, seguido de pós-teste de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

6 RESULTADOS

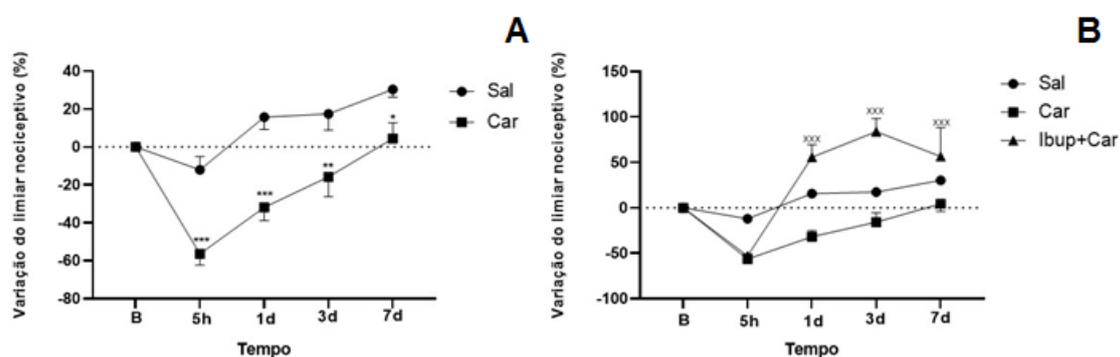
Esta seção apresenta os resultados obtidos neste estudo, considerando a avaliação da resposta nociceptiva e a avaliação histológica.

6.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA

A análise comparativa entre os grupos testados com os fármacos e a ozonioterapia mostrou diferença no limiar da resposta de nocicepção, conforme descrição que segue.

Os resultados observados demonstraram que a administração intramuscular da carragenina no masseter dos ratos reduziu o limiar de nocicepção em todos os tempos testados. O tratamento dos animais com ibuprofeno alterou esta resposta, elevando o limiar de nocicepção acima dos valores do grupo tratado com carragenina (Car), nos períodos de 1d ($p<0,001$), 3d ($p<0,001$) e 7d ($p<0,001$) e do grupo controle (Sal) (**Figura 3**).

Figura 3 – Efeito da administração da carragenina (Car) (A) e do tratamento dos animais com ibuprofeno (dose de 14 mg/ Kg) (B) sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica, mensurado com analgesímetro digital – teste de von Frey. Os resultados foram normalizados como porcentagens dos valores basais (100%) em cada grupo e representam a média do limiar de retirada da cabeça do animal (g) \pm epm (n = 7). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ comparado com grupo salina (Sal). ^{xxx} $p<0,001$ comparado com grupo carragenina (Car). Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

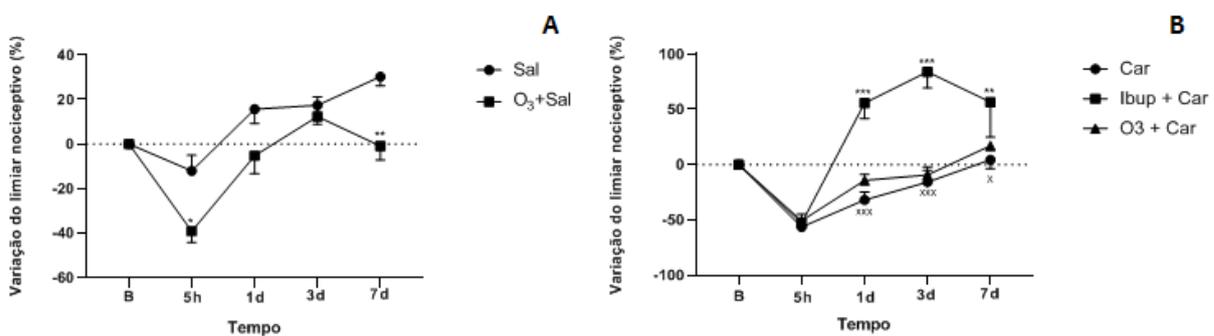


Fonte: Dados da pesquisa.

A ozonioterapia nos animais injetados com carragenina (O3+Car) não alterou o limiar de nocicepção em relação ao grupo sem tratamento e quando comparados ao grupo controle (Sal), a administração da mistura de gás ozônio (O3+Sal) diminuiu o limiar de nocicepção, nos períodos de

5h ($p<0,05$) e 7 d ($p<0,01$), sugerindo que esse agente, quando administrado por via intramuscular, causou hipernocicepção nos animais (**Figura 4**).

Figura 4 – Efeito do tratamento com ozônio nos animais inoculados com carragenina ou Ibuprofeno sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica, mensurado com analgesímetro digital (teste de von Frey). Os resultados foram normalizados como porcentagens dos valores basais (100%) em cada grupo e representam a média do limiar de retirada da cabeça do animal (g) \pm epm (n=7). **(A)** * $p<0,05$, ** $p<0,01$ comparado com grupo controle (Sal). **(B)** ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ em relação ao grupo carragenina. ^x $p<0,05$, xxx $p<0,001$ em relação os grupos Ibup+Car. Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: Dados da pesquisa.

6.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A fim de examinar os efeitos da ozonioterapia sobre a estrutura tecidual do músculo masseter, o presente estudo fez uma análise em microscopia de luz de amostras do masseter de animais submetidos aos diferentes tratamentos propostos. Os principais achados estão descritos a seguir.

Os grupos Sal (controle) e Ibup+Sal mostraram padrões semelhantes de alterações teciduais durante o primeiro dia após a injeção de solução salina. Edema, hemorragia, inflamação e aumento dos espaços endomisial e perimisial não foram observados em ambos os grupos. Alguns espécimes apresentavam áreas discretas de mionecrose e de fibras musculares em regeneração, provavelmente causadas pela inserção da agulha durante a administração de solução salina no músculo. Após oito dias, as pequenas áreas de tecido desorganizado estavam completamente reparadas e sem inflamação, principalmente no grupo Ibup+Sal. Algumas amostras de ambos os grupos mostravam deposição de um material fracamente eosinófilo (deposição colagênica), separando feixes de fibras musculares e compatível com uma discreta fibrose.

Os masseteres dos animais do grupo O3+Sal não mostraram edema, hemorragia, fibrose e alargamento dos espaços endomisiais e perimisiais em nenhum dos tempos estudados. Um dia após a infiltração da solução salina, um discreto infiltrado inflamatório agudo estava associado com discretas áreas com fibras musculares em degeneração, as quais exibiam hiperacidofilia, perda de estriação transversal, fragmentação e ruptura. Tais achados contrastaram com a ausência de infiltrado inflamatório e de destruição tecidual nos demais grupos tratados com solução salina. Oito dias após a intervenção, um infiltrado inflamatório crônico, às vezes misto, constituído por macrófagos, raros linfócitos e alguns neutrófilos, estava associado a áreas com discreta ou moderada perda de fibras musculares. Diferente dos grupos Sal e Ibup+Sal, o grupo O3+Sal mostrou alguns neutrófilos difusamente distribuídos pelas áreas lesionadas no último período de análise. Nas suas proximidades, muitos fibroblastos e algumas miócitos em regeneração foram observados, sugerindo uma tentativa de reparo do tecido lesado.

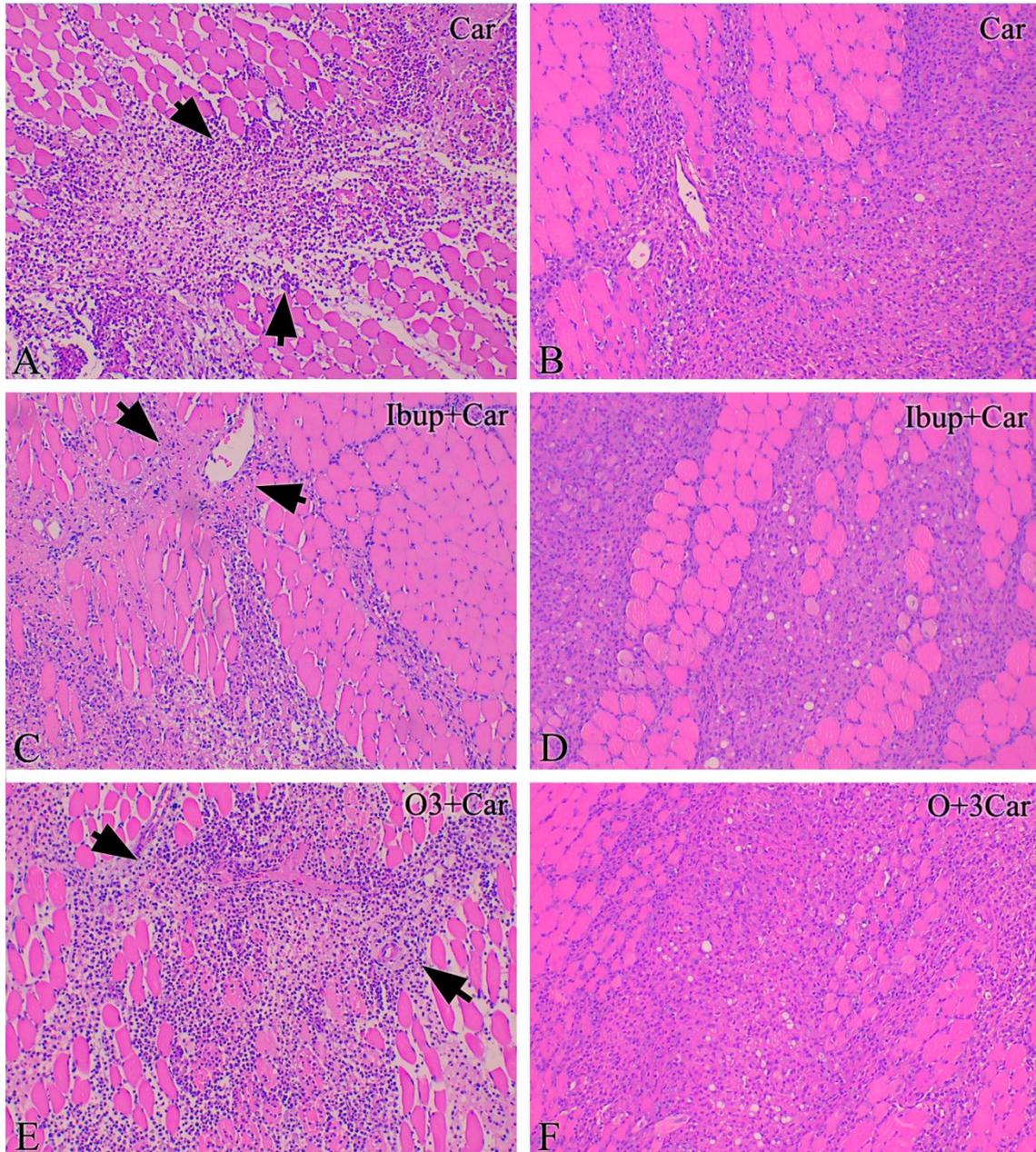
Um dia após a lesão inflamatória, os controles hiperalgésicos (grupo Car) apresentaram uma inflamação aguda intensa ou moderada, acompanhada de muitos macrófagos, alguns mastócitos e muitos neutrófilos em áreas de mionecrose severa. Alguns macrófagos e alguns mastócitos e plasmócitos também foram vistos nos espaços perimisiais. O endomísio e o perimísio estavam discretamente aumentados e acompanhados de edema moderado e generalizado. A severidade de hemorragia foi variável, sendo predominantemente leve. Oito dias após o trauma, um intenso infiltrado de células mononucleares estava associado a uma severa degeneração e destruição de fibras musculares. O infiltrado consistia em muitos macrófagos e alguns linfócitos. O endomísio e perimísio estavam moderadamente ampliados. Complicações como edema, hemorragia e fibrose não foram observadas. Havia poucos achados histológicos compatíveis com a regeneração das fibras musculares em degeneração e a extensão da área destruída era maior do que a observada no primeiro dia de análise.

Um dia após a injeção de carragenina, os masseteres dos ratos do grupo Ibup+Car apresentaram uma inflamação aguda que variou entre moderada e severa. O infiltrado inflamatório era composto principalmente por macrófagos, mastócitos e muitos neutrófilos. Algumas áreas de endomísio e perimísio estavam ligeiramente aumentadas. Em contraste com o grupo Car, o grupo Ibup+Car exibiu uma mionecrose moderada, hemorragia e edema mais discretos. Oito dias após a administração de carragenina, complicações como edema, hemorragia e fibrose estavam ausentes no músculo afetado. O perimísio e o endomísio estavam discretamente ampliados. Um infiltrado inflamatório crônico intenso composto por muitos macrófagos, alguns linfócitos e mastócitos preenchia os amplos espaços deixados pela mionecrose. Muitos macrófagos estavam vacuolizados.

Algumas alterações microscópicas compatíveis com fibras musculares em degeneração foram observadas. Similarmente ao grupo Car, a área de degeneração e necrose tecidual era maior do que a observada no primeiro dia de análise e foram raros os achados indicativos de regeneração das fibras musculares danificadas.

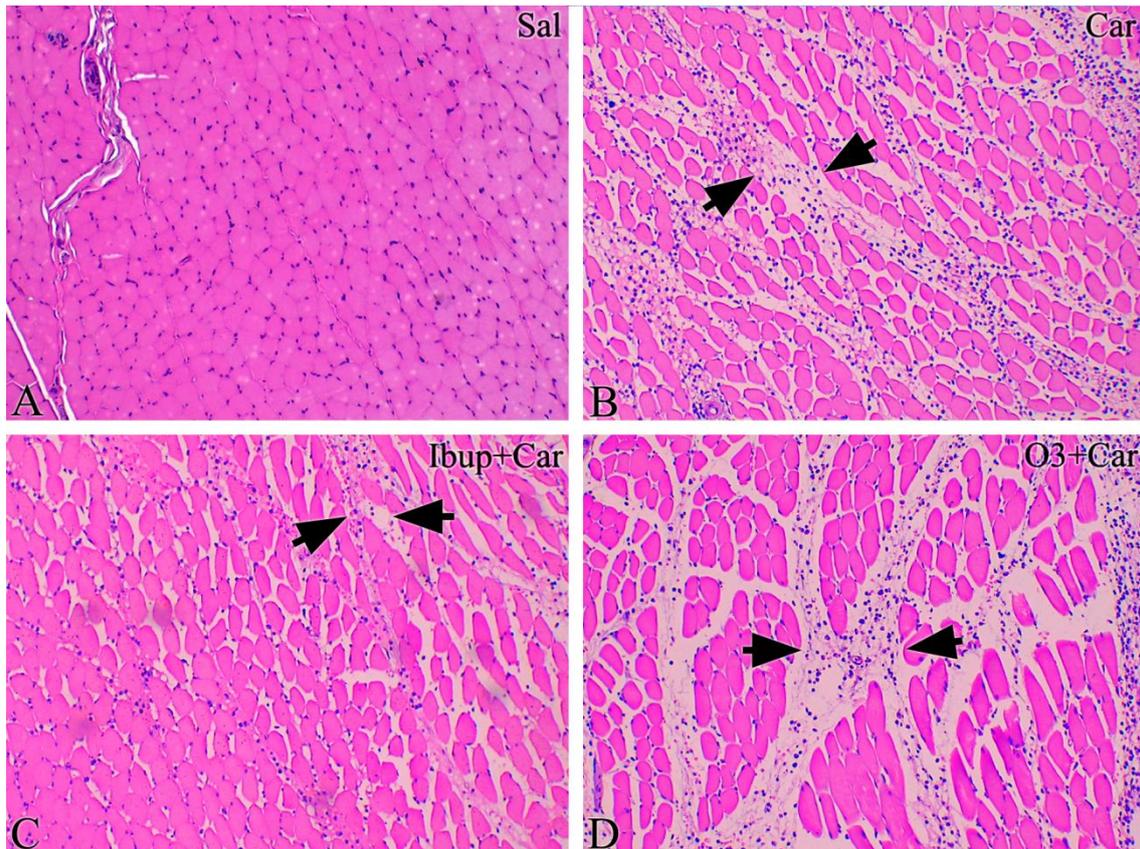
Um dia após a administração da carragenina, os animais do grupo O3+Car apresentaram predominantemente uma inflamação aguda intensa (neutrófilos, muitos macrófagos e alguns mastócitos dispersos), associada a áreas com intensa mionecrose e com fibras musculares em degeneração. O endomísio e o perimísio estavam moderadamente espessados. O edema era intenso, enquanto a hemorragia variava de moderada a intensa. Oito dias após a indução da inflamação, uma amostra mostrava uma hemorragia e um edema discretos. Os demais espécimes não mostravam edema, hemorragia e fibrose. Os espaços endomisial e perimisial estavam menos espessados quando comparados com o mesmo grupo no primeiro dia de análise e com os grupos Car e Ibup+Car, no último período de avaliação. Decorridos oito dias da infiltração de carragenina, um intenso infiltrado inflamatório crônico, às vezes misto, composto por alguns linfócitos e muitos macrófagos, invadia as áreas de severa destruição tecidual. De permeio, muitos fibroblastos ativos estavam distribuídos ao longo das áreas de mionecrose. Em muitas áreas de inflamação, alguns neutrófilos e muitas miofibras em regeneração foram observados. Nas amostras dos grupos Car e Ibup+Car, esses achados apresentaram menor frequência. A área de destruição muscular era maior que no primeiro período de avaliação, mas equivalente a áreas dos demais grupos tratados com carragenina.

Figura 5- Fotomicrografias mostrando secções transversais das fibras musculares do músculo masseter dos grupos tratados com carragenina. No 1º dia após a infiltração de carragenina, todos os grupos, Car, Ibup+Car e O3+Car (**A**, **C** e **E**) mostraram áreas de necrose e degeneração das fibras musculares esqueléticas no local de infiltração da carragenina, associadas a um infiltrado inflamatório agudo com muitos neutrófilos. Notar que os grupos Car e O3+Car (**A** e **E**) exibiam áreas mais amplas de mionecrose e um endomísio espessado quando comparados com o grupo Ibup+Car (**C**) (setas). Decorridos 8 dias da inoculação de carragenina, a inflamação aguda inicial foi convertida em uma inflamação crônica com muitos macrófagos e alguns linfócitos em todos os grupos tratados com carragenina (**B**, **D** e **F**). Notar que as áreas de necrose e degeneração foram maiores em comparação com o período de 1 dia, sendo semelhantes em todos grupos no último período. Coloração H&E. 100X.



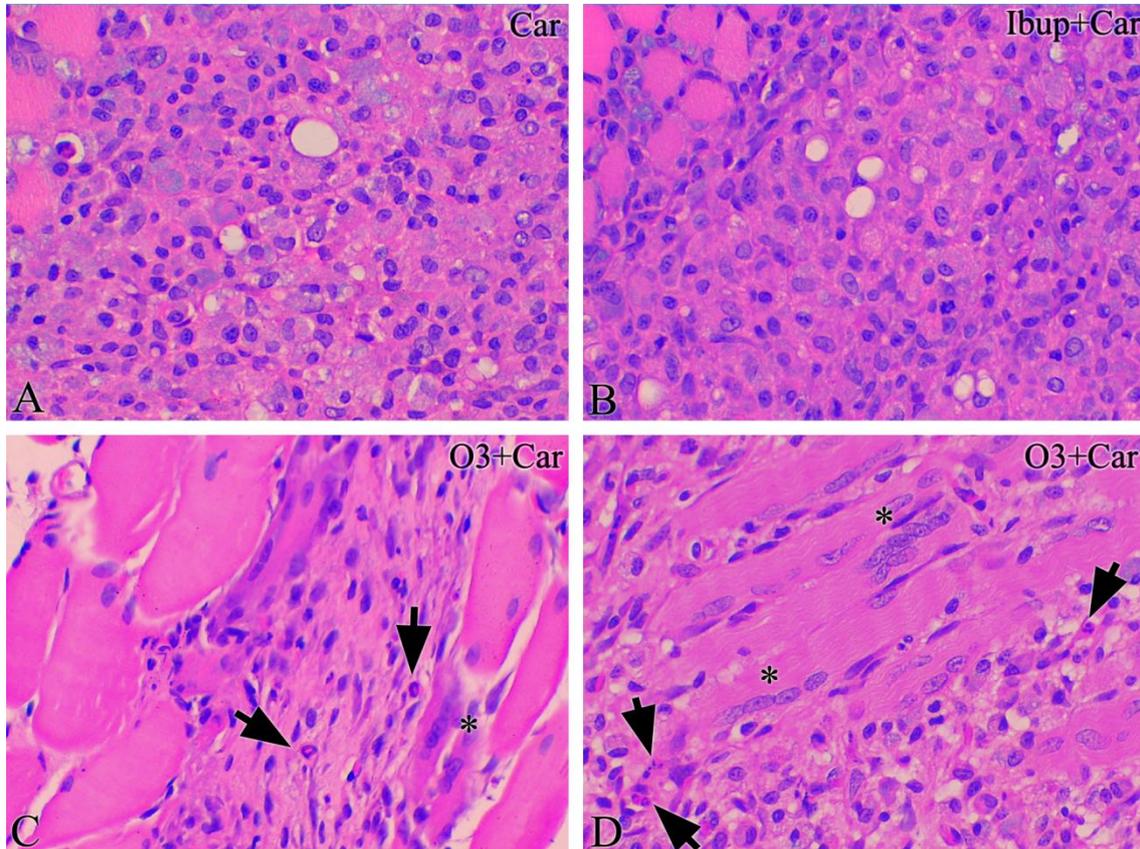
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 6 - Fotomicrografias mostrando secções transversais das fibras musculares do músculo masseter dos grupos Sal, Car, Ibup+Car e O3-Car no tempo experimental de 1 dia. Em (A), pode-se observar feixes de fibras musculares esqueléticas poliédricas, acidófilas e bem preservadas envolvidas individualmente por endomísio e perimísio de aspecto normais nos animais tratados apenas com solução salina (Sal). Em (B), (C) e (D), pode-se observar a expansão do tecido intersticial (perimísio e endomísio) por material amorfo ou fibrilar, claro ou pálido e eosinófilo compatível com edema, separando as miofibras individuais e os feixes de fibras musculares. Notar diferenças na largura do endomísio e perimísio em função do edema (setas) entre os grupos Car, Ibup+Car e O3-Car. Coloração H&E. 100X.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 7- Fotomicrografias mostrando secções transversais das fibras musculares do músculo masseter dos grupos Car, Ibup+Car e O3-Car no tempo experimental de 8 dias. Em (A) e (B), os grupos Car e Ibup+Car mostram áreas com infiltrado inflamatório crônico com muitos macrófagos e alguns linfócitos. Em (C) e (D), uma fileira de núcleos vesiculados (asteriscos) no interior das fibras musculares em regeneração pode ser observada nas amostras dos ratos do grupo O3+Car. Notar a presença de neutrófilos, uma célula incomum no período de 8 dias após a administração de carragenina, nas proximidades das fibras musculares em regeneração (setas). Coloração H&E. 400X.



Fonte: Dados da pesquisa.

7 DISCUSSÃO

Em estudo anterior, relatamos que a administração intramuscular de toxina botulínica reduziu a hiperalgesia no músculo masseter de ratos, induzida pela carragenina, porém sem efeito sobre o edema inflamatório e sobre o dano tecidual.¹⁵

No presente trabalho, a fim de buscar novas alternativas para o alívio da dor nas mialgias, especialmente nos músculos mastigatórios, investigamos os efeitos da ozonioterapia sobre a nocicepção relacionada ao processo inflamatório e à estrutura tecidual do músculo masseter após sua administração por via intramuscular. A ozonioterapia tem sido utilizada nas últimas três décadas como agente terapêutico coadjuvante, mas muitas vezes como principal opção para o tratamento de diversos distúrbios ou doenças; muitos trabalhos experimentais e clínicos têm confirmado o seu efeito benéfico em patologias relacionadas à carga oxidativa e inflamatória³⁹, embora seu mecanismo molecular não tenha sido completamente elucidado. Apesar dos resultados favoráveis observados na literatura, a presente investigação mostrou que a ozonioterapia não foi eficaz em neutralizar a ação nociceptiva da droga carragenina, além de não ter sido capaz de proteger o músculo masseter da destruição tecidual inflamatória induzida pela carragenina nos períodos estudados.

A nocicepção experimental tem sido estudada principalmente pela inoculação de drogas inflamatórias nas patas de roedores com o objetivo de testar o potencial analgésico e/ou anti-inflamatório de drogas.¹⁷ No presente estudo, com base no método desenvolvido por Ren (1999)⁴⁵ para avaliar o limiar nociceptivo mecânico e a alodinia nos ratos, optamos por inocular a droga inflamatória carragenina no músculo masseter a fim de testar o gás ozônio como alternativa para o tratamento de mialgias de músculos mastigatórios, especialmente aquelas relacionadas à DTM. Após a injeção de carragenina, observou-se o desenvolvimento de um edema inicial, seguido por um período de alodinia, cujo pico foi alcançado 4 horas após a inoculação, permanecendo por 24 a 96 horas.^{45,49} Em nosso modelo, a inoculação da carragenina no músculo masseter produziu uma inflamação aguda, modificando o limiar nociceptivo da região afetada de forma similar ao modelo de hiperalgesia induzida por carragenina em pata de roedores.^{11,50,51} A avaliação histológica mostrou várias alterações teciduais produzidas pela carragenina. Um dia após a administração da carragenina, a área central do músculo masseter mostrava hemorragia, edema e uma destruição tecidual severa com presença de um infiltrado inflamatório agudo com muitos neutrófilos. Decorridos oito dias após a intervenção, hemorragia e edema estavam ausentes, mas havia áreas de necrose e degeneração das fibras muscular associadas a um infiltrado inflamatório crônico intenso,

com muitos macrófagos. Esses achados histológicos foram similares aos observados por Radhakrishnan et al. (2003), quando injetaram carragenina na articulação femorotibial e no músculo gastrocnêmio de ratos. Em ambos os casos, a inflamação inicial foi convertida posteriormente em uma resposta inflamatória com macrófagos e alguns mastócitos.¹⁰

O estudo antinociceptivo comparativo mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos Car e O3+Car nos períodos de 5 horas, 1, 3 e 7 dias. No presente trabalho, o pico da hiperalgesia ocorreu no período de 5 horas e não foi neutralizada por nenhuma das drogas terapêuticas empregadas, visto que o ibuprofeno, padrão-ouro para determinação de efeito de uma terapia em nosso modelo experimental, somente elevou o limiar de nocicepção acima dos valores do grupo tratado com carragenina, após um dia de acompanhamento. Portanto, a análise adequada do efeito da ozonioterapia somente pode ser realizado um dia após a aplicação da carragenina. Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Lorama et al. (2007) que observaram um pico nociceptivo no local da injeção de carragenina por volta de 6 horas após a administração de carragenina, coincidindo com uma infiltração de moderada a severa de células inflamatórias. Os resultados de nocicepção, observados para o grupo O3+Car, se relacionaram com os achados histológicos, os quais mostraram um infiltrado inflamatório, necrose e degeneração severas na área de inoculação da carragenina.

Com base nessas evidências, acredita-se que a ozonioterapia não foi capaz de regular a inflamação inicial responsável pela atração de células inflamatórias e pela liberação de mediadores inflamatórios envolvidos na sensibilização de nociceptores, facilitação da transmissão dolorosa e, conseqüentemente, no estabelecimento de um quadro hiperalgesia. A aparente inexistência de efeito antinociceptivo da ozonioterapia no presente estudo é surpreendente, uma vez que estudos clínicos em humanos têm mostrado resultados favoráveis no alívio da dor muscular em pacientes com SDM.^{1,14,52}

Um aspecto a ser considerado é o fato de o modelo experimental empregado ser inadequado para avaliar efeitos benéficos da ozonioterapia, visto que o modelo de inflamação induzida pela carragenina se caracteriza pela ativação de neutrófilos, células com potencial de liberar as enzimas lisossômicas presentes em seus grânulos e as espécies reativas de oxigênio para o meio extracelular. Essas substâncias, quando liberadas, podem danificar as células normais e o endotélio vascular. Considerando os prováveis mecanismos de ação da ozonioterapia, que incluem a liberação de óxido nítrico e radicais livres de oxigênio, pode-se supor que esta terapia poderia amplificar os efeitos do agente injuriante inicial sobre o músculo masseter.

De fato, o bom senso proibiria o uso do ozônio em condições em que a inflamação está relacionada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativação de cicloxigenases e produção excessiva de ROS. Contudo, na última década, tem sido demonstrado o uso exitoso da ozonioterapia em doenças degenerativas crônicas, tendo em comum uma inflamação expressa por um estresse oxidativo crônico. Andreula e colaboradores (2003), por exemplo, observaram que a injeção intradiscal e periganglionar combinada de ozônio medicinal, em pacientes com sinais clínicos de compressão da raiz nervosa do disco lombar, e a evidência imaginológica de hérnia de disco exibiram melhora clínica.⁵³ Calunga e colaboradores (2012) mostraram que a ozonioterapia diminuiu o estresse oxidativo, alcançando um equilíbrio redox intra-articular e uma redução significativa da dor em pacientes com osteoartrite, apresentando uma resposta satisfatória em 80% desses pacientes, após um ano de acompanhamento.⁵⁴

O conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares é limitado, mas cogita-se que os benefícios terapêuticos da ozonioterapia poderiam ser alcançados pelo aumento da liberação de óxido nítrico, levando à vasodilatação e aumentando o fluxo sanguíneo nos tecidos. Além disso, uma maior expressão de fatores importantes no processo de reparo de feridas, como fator de crescimento transformante β (TGF- β) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), tem sido descrita em estudos clínicos e experimentais de cicatrização de feridas por Zanardi e colaboradores (2016). Tais evidências sinalizam que a ozonioterapia pode ser utilizada para o tratamento de condições fisiopatológicas nas quais o processo inflamatório é intenso e o sistema imunológico precisa ser acionado eficazmente.⁵⁵

Um provável mecanismo de ação da ozonioterapia tem sido proposto a partir do seu efeito sobre enfermidades relacionadas ao estresse oxidativo. Diversas patologias têm sido associadas à presença de estresse oxidativo crônico, caracterizado por altos níveis de ROS e RNS, que levam à formação de várias moléculas bioativas (aldeídos, isoprostanos e produtos de peroxidação em geral). Tais moléculas, quando presentes, atuam como segundos mensageiros e podem contribuir para danificar os componentes proteicos, lipídicos e o material genético das células. O princípio do efeito terapêutico da mistura de oxigênio e ozônio sobre os fluidos biológicos está pautado na ativação mais eficiente de um sistema não enzimático (ácido úrico, ácido ascórbico, glicose, cisteína, cisteamina, taurina, triptofano, histidina, metionina e glutatona), capaz de induzir um estresse oxidativo mais discreto e transitório e de ativar o sistema celular enzimático defensivo (catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, glutatona transferase e heme oxigenase 1), os quais poderiam diminuir o estresse oxidativo lesivo, ativado por determinadas patologias.¹⁸

Um achado importante no presente estudo e bastante comum em outros trabalhos com carragenina foi a presença de macrófagos em todas as amostras infiltradas com carragenina, independente da terapia utilizada.^{52,56} A avaliação histológica dos músculos inflamados mostrou um tecido desorganizado, com fibras musculares parcialmente hialinizadas e fragmentadas e acompanhadas por muitas neutrófilos e macrófagos no primeiro dia após injeção de carragenina. Oito dias após o tratamento com carragenina, a quantidade de macrófagos tinha aumentado, estando, muitas vezes, em íntima associação com as miofibras em degeneração. Os macrófagos parecem ser muito importantes para o reparo muscular. Seu papel no tecido danificado extrapola a sua função na remoção de restos celulares. Em um primeiro momento, os macrófagos com perfis pró-inflamatórios invadem o tecido danificado e, após alguns dias, essas células são convertidas em macrófagos anti-inflamatórios.^{57,58} Enquanto isso, células satélites e células-tronco do tecido muscular esquelético são ativadas, proliferam e sofrem diferenciação miogênica terminal e recompõem as fibras musculares perdidas. A presença concomitante de células precursoras miogênicas e de macrófagos nas áreas em regeneração demonstra que os macrófagos podem ser importantes na orquestração da miogênese durante a regeneração de músculo esquelético danificado.⁵⁸ Ainda que o presente trabalho não tenha pretendido realizar um estudo histomorfométrico dos macrófagos em função dos grupos, a avaliação histológica qualitativa não indicou diferenças importantes na quantidade de macrófagos entre os grupos Car, Ibuf+Car e O3+Car, nos períodos estudados. Estudos histomorfométricos e imuno-histoquímicos, com ênfase na identificação de subclasses de macrófagos e das células percussoras miogênicas, em um modelo de injúria muscular tratado com ozonioterapia, podem apresentar a acurácia necessária para demonstrar uma relação entre o gás ozônio e a regeneração, com foco na sua capacidade de regular as células inflamatórias, especialmente os macrófagos e as células satélites do músculo esquelético.

A avaliação histológica mostrou que os ratos tratados com carragenina e submetidos à ozonioterapia (O3+Car) mostraram áreas extensas de necrose e de degeneração de miócitos equivalentes aos dos animais tratados apenas com carragenina (Car), nos dois períodos estudados, sugerindo que o protocolo de ozonioterapia empregado foi incapaz de neutralizar o dano tecidual provocado pela inflamação. Surpreendentemente, o grupo não tratado com carragenina (O3+Sal) também exibiu áreas discretas ou moderadas de necrose e degeneração muscular, sugerindo que a ozonioterapia produziu uma lesão tecidual. Nós postulamos que a penetração da agulha por três sessões consecutivas (0h, 24h e 3 dias) nos grupos O3+Car e O3+Sal tenham gerado um dano tecidual adicional, com prejuízos para o reparo muscular em ambos os grupos O3+Car e O3+Sal.

Calunga e colaboradores (2007)⁵⁴ afirmaram que outras vias de administração para ozônio, como a via intraperitoneal e via retal, podem ser menos danosas em áreas com dano tecidual inflamatório pré-existente. Alguns trabalhos têm mostrado que o ozônio administrado pela via intraperitoneal apresenta um efeito protetor sobre o músculo cardíaco, o tecido ósseo e o mesentério, especialmente em modelos experimentais de lesão tecidual causada por isquemia e posterior reperfusão sanguínea.^{59,60,61,62} Vale destacar que o presente estudo optou pela via intramuscular, em decorrência desta via ser utilizada nos estudos clínicos do efeito da ozonioterapia sobre a dor miofascial em humanos.^{2,14} Contudo, considerando a possível interferência do modo de administração empregado sobre os resultados histológicos em nosso estudo, sugere-se o desenvolvimento de estudos sobre ozonioterapia, utilizando outras formas de administração, como a via intraperitoneal.

Oito dias após a inoculação de solução salina, metade das amostras dos grupos Sal e Ibup+Sal mostraram muitos fibroblastos e muitas fibras colágenas que preenchiam uma pequena área originalmente ocupada por fibras musculares esqueléticas degeneradas ou necrosadas, provavelmente pela ação mecânica de uma agulha hipodérmica. Tal achado histológico foi compatível com um estágio inicial de uma fibrose e não foram observados nos grupos O3+Sal, Car, Ibup+Car e O3+Car. O fato de a fibrose não ser um evento comum nas nossas amostras está de acordo com a concepção de que drogas tóxicas, como a carragenina, podem causar danos musculares extensos, mas, em geral, o reparo é extremamente favorável e a ocorrência de uma fibrose é mínima.¹⁸ Ainda que uma análise criteriosa da fibrose só possa ser feita com períodos mais longos de acompanhamento, quando há o desfecho final do reparo, postulamos que a ausência de indícios de fibrose nos grupos O3+Sal, Car, Ibup+Car e O3+Car esteja relacionado com fato de suas lesões serem mais extensas e, portanto, demandarem mais tempo para serem resolvidas. Alguns trabalhos têm indicado um efeito benéfico da ozonioterapia sobre a fibrose em vários modelos experimentais. Di Filippo e colaboradores (2010)⁵⁹, demonstraram que o tratamento com a mistura O2 e O3 reduziu a fibrose estromal e a quantidade de fibrócitos no tecido cardíaco e no músculo gastrocnêmico de ratos submetidos a uma atividade física prolongada e de alta intensidade. Somay e colaboradores (2017)⁶³ observaram que a ozonioterapia estimulou a regeneração do nervo ciático lesionado, sem causar aumento da fibrose. Contudo, em virtude das limitações do presente estudo, não foi possível deduzir algum efeito da ozonioterapia sobre a fibrose muscular, após uma injúria provocada por agente tóxico.

Um achado histológico curioso foi a presença discreta de neutrófilos nas proximidades de fibras musculares esqueléticas, exibindo sinais de regeneração (fibras musculares com sarcoplasma

basófilo e fileiras de núcleos de mioblastos no interior das fibras), nos grupos O3+Sal e O3+Car, no período de oito dias, enquanto que esses leucócitos não foram observados nos demais grupos experimentais nesse tempo experimental. Tal aspecto pode estar relacionado a um possível efeito regenerativo, com participação dos neutrófilos da ozonioterapia. Hyde e colaboradores (1999)⁶⁴, por exemplo, demonstraram que a inalação de ozônio em macacos-rhesus produziu um influxo de neutrófilos para a área injuriada, os quais foram importantes para a remoção de células epiteliais danificadas e, portanto, no reparo das vias áreas. Os neutrófilos estão envolvidos na resposta imune inata que envolve uma série de respostas rápidas e coordenadas que culminam na fagocitose e morte de patógenos invasores.⁶⁵ Os neutrófilos produzem e armazenam muitos elementos antimicrobianos como oxidantes, proteinases e peptídeos antimicrobianos, além de sintetizarem elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS).^{66,67} Durante a fagocitose de patógenos invasores, os compostos antimicrobianos, contidos nos seus grânulos, e ROS gerados na membrana do fagossomo são liberados diretamente no fagossomo, gerando produtos citotóxicos que potencializam a morte intracelular.⁶⁷ Contudo, em algumas circunstâncias patológicas, os neutrófilos podem liberar compostos citotóxicos potentes no espaço extracelular que danificam os tecidos do próprio hospedeiro.^{67,68,69} Por outro lado, há evidências indicando um papel para o ROS e RNS na regulação de eventos de sinalização celular, essenciais envolvidas na homeostase, proliferação e diferenciação celular e respostas inflamatórias e imunes^{70,71,72}, permitindo a especulação de que algumas moléculas produzidas pelos neutrófilos poderiam estar envolvidas na regulação da inflamação, porém não necessariamente no estímulo a este processo. Teixeira e colaboradores (2003)⁶⁶, por exemplo, mostraram que camundongos tratados com anticorpos neutralizantes para neutrófilos e monócitos exibiram uma resposta regenerativa deficiente em um modelo de miotoxicidade induzida por veneno de cobra. Estudos futuros devem se concentrar na identificação dos fatores específicos liberados pelos neutrófilos e envolvidos nos eventos de reparo do músculo esquelético, a fim de direcioná-los para alcançar uma cura ideal.

O exame histológico das amostras de músculos dos ratos do grupo O3+Sal no tempo experimental de oito dias mostrou um infiltrado inflamatório discreto, com alguns linfócitos e neutrófilos, um padrão histológico não observado nos grupos Sal e Ibut+Sal. Considerando os danos sucessivos provocados pela agulha hipodérmica, um aumento do suprimento de oxigênio é crucial para a recuperação das células danificadas. O estímulo da irrigação sanguínea efetuado pela ozonioterapia poderia aumentar a liberação de fatores de crescimento e de citocinas, contribuindo para a instalação de um processo inflamatório controlado que favorece o reparo tecidual.^{33,54} A presença de inflamação pode ser justificada pelo fato de o processo de ozonização em um tecido-

alvo representar um estresse oxidativo agudo. Contudo, a depender da dose do ozônio, o estresse oxidativo não é deletério, sendo capaz de desencadear uma infinidade de respostas biológicas que visam a restaurar a homeostase e estimular o reparo tecidual.⁵⁴

A droga ibuprofeno mostrou um efeito antinociceptivo nos períodos de 1 dia, 3 dias e 7 dias, quando comparado com os grupos apenas com carragenina (Car) e com carragenina e ozonioterapia (O3+Car). Também demonstrou um pequeno efeito protetor no primeiro dia após a inoculação da carragenina, visto que o edema, o alargamento dos espaços endomisiais e perimisiais e a destruição tecidual induzida pela carragenina foram menos severos nos animais do grupo Ibup+Car. No presente estudo, o anti-inflamatório não esteroide (AINE) ibuprofeno foi utilizado nos grupos controle positivo pelas suas atividades anti-inflamatória e analgésica. Os AINEs inibem a ciclooxigenase (COX), enzima responsável pela transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos. As prostaglandinas exercem uma ação vasodilatadora potente, resultando em um aumento da permeabilidade vascular, com extravasamento de líquidos e glóbulos brancos, fenômenos observados nas fases iniciais do processo inflamatório induzido pela carragenina. Portanto, o ibuprofeno poderia exercer um importante efeito anti-inflamatório no modelo de dor inflamatória empregado no presente estudo, visto que a inibição da síntese da COX a base da ação dos AINEs pode ser eficaz no tratamento da dor e inflamação. A inflamação induzida por carragenina demonstrou ser altamente preditiva da atividade de drogas anti-inflamatórias, na doença inflamatória humana, e as doses de AINEs, neste modelo, se correlacionam bem com a dose efetiva em pacientes.⁷⁴

Este trabalho foi o primeiro estudo que avaliou o efeito da ozonioterapia em um modelo de inflamação mediado pela carragenina, no músculo masseter de ratos. Os resultados apresentados aqui revelaram que a ozonioterapia por via intramuscular no local da injúria não reduziu a nocicepção induzida pela carragenina, além de não mostrar um efeito reparador sobre o músculo esquelético lesado quimicamente.

Uma das limitações do presente estudo foi o emprego de oito dias como último período de avaliação histológica e de nocicepção, visto que o reparo tecidual completo da lesão induzida pela carragenina pode se estender por mais de dois meses em roedores.¹⁰ Os próximos estudos devem se concentrar nos efeitos de múltiplas injeções de ozônio e na combinação de injeções em outros grupos musculares e em outros modelos experimentais de inflamação, bem como a investigação da eficácia de outras nas vias de administração da ozonioterapia.

8 CONCLUSÃO

- A ozonioterapia, por via intramuscular, não reduziu a nocicepção a um modelo de inflamação induzida por carragenina no músculo masseter dos ratos;
- A ozonioterapia administrada por via intramuscular não apresentou efeito reparador sobre o músculo masseter injuriado pela droga carragenina nos tempos estudados, visto que os animais submetidos à ozonioterapia mostraram áreas de necrose e degeneração muscular, edema e inflamação equivalentes ao grupo tratado apenas com carragenina;
- A presença de mais achados histológicos sugestivos de regeneração das fibras musculares danificadas nos grupos submetidos à ozonioterapia indicam um possível efeito regenerativo do gás ozônio sobre a injúria no músculo esquelético.

REFERÊNCIAS

1. Rocha-Filho PAS. Cefaleias primárias e síndrome de dor miofascial. *Headache Medicine*. 2014; 6 (92): 59-63.
2. Celakil T, Muric A, Gokcen RB, Evlioglu G, Keskin H. Effect of high-frequency biooxidative ozone therapy for masticatory muscle pain: a double-blind randomized clinical trial. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2017; 44(6):442–51.
3. Celakil T, Muric A, Roehlig BG, Evlioglu G. Management of pain in TMD patients: Biooxidative ozone therapy versus occlusal splints. *The Journal of Craniomandibular & Sleep Practice*. 2017; 37(2):1-10.
4. Isong U, Gansky SA, Plesh O. Temporomandibular joint and muscle disorder-type pain in U.S. adults: the National Health Interview Survey. *J Orofac Pain*. 2008; 22(4): 317- 22.
5. Simons DG, Travel JG, Simons PT. *The Trigger Point manual*. 2nd ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1999. Upper Half of Body, v. 1.
6. Borges GA, Elias ST, Silva SMM, Magaçães PO, Macedo SB, Ribeiro APD et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2017; 45(3): 364-70.
7. Jesus CCL, Santos FC, Jesus LMOB, Monteiro I, Castro Santana MSSC, Trevisani, V.F.C. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *PlosOne*. 2017; 12(7):1-17.
8. Dogan, M.; Doğan, D.O.; Duger, C.; Kol, I.O.; Akpınar, A.; Mutaf, B. et al. Effects of high-frequency bio-oxidative ozone therapy in temporomandibular disorder-related pain. *Medical Principles and Practice*. 2014; 23(6):507- 10.
9. Azarpazhooh L. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent*, Elsevier. 2007; 36(2):104-16.
10. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*. 2003; 104(3):567-77.
11. Favre-Guilmard C, Chabrier PE, Kalinichev M. Bilateral analgesic effects of abobotulinumtoxinA (Dysport®) following unilateral administration in the rat. *Eur J41 Pain*. 2017; 21(5):27-37.
12. Maia MLM, Ribeiro MA, Maia LG, Stuginski-Barbosa J, Costa YM, Porporatti AL et al. Evaluation of low-level laser therapy effectiveness on the pain and masticatory performance of patients with myofascial pain. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(1):29-35.
13. Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain*. 2013; 14(11):1255-69.

14. Raeissadat SA, Rayegani SM, Forogh B, Abadi PH, Moridni M et al. Injeção intraarticular de ozônio ou ácido hialurônico: qual deles é superior em pacientes com osteoartrite de joelho? Um ensaio clínico randomizado de 6 meses. *J Pain Res.* 2018; 11: 111-17.
15. Neves ID, Aguiar MC, Silva LLC. Efeitos da toxina botulínica A em masseteres de ratos em modelo experimental de dor inflamatória. Dissertação. Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciência da Saúde, Salvador, 2019. 55p.
16. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone- generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res.* 2000 Nov-Dec; 34(6):498-501. doi: 10.1159/000016630. PMID: 11093025.
17. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* 2004; 13(1):3-11. doi:10.1080/0962935062000197083.
18. Zanardi I; Borrelli E; Valacchi G; Travagli V; Bocci V. Ozone: A Multifaceted Molecule with Unexpected Therapeutic Activity. *Curr Med Chem.* 2016; 23(4):304-14. doi: 10.2174/0929867323666151221150420. PMID: 26687830.
19. Merskey H; Bogduk N. Classification of chronic. Pain. 2nd. ed. Seattle: IASP Press, 1994.
20. Ferreira, SH.; Neto, AO. Dor: princípios e práticas. 2ed. Porto Alegre: Artmed. 2009; 265-279.
21. Pereira, FS.; Rabello, GD. Aspectos psicológicos envolvidos no processo de cronificação algica. *Arquivos Catarinenses de Medicina.* 2003; 32(1): 19-20.
22. Carvalho, WA.; Lemônica, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória: modulação periférica e avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia.* 1998; 48(2): 26-31.
23. Chapman CR, Gavrin J. Suffering: the contributions of persistent pain. *Lancet.* London. 1999; 353: 2233-7.
24. Porto, C. C. Exame clínico: bases para a prática médica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
25. Zamperini CA, Batista AUD, Oliva EA, Alencar Júnior FGP. Tratamento de dor de cabeça relacionada com a dor miofascial: relato de caso clínico. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2013; 34(1): 31-6.
26. Giamberardino MA, Affaitati GFA, Costantini R. Myofascial pain syndromes and their evaluation. *Best Practice e Research Clinical Rheumatology.* 2011; 25(2):185-98.
27. Fishbain DA, Goldberg M, Meagher RB, Steele R, Rosomoff H. Male and female chronic pain patients categorized by DSM-III psychiatric diagnostic criteria. *Pain.* 1986; 26(2):181-97.

28. Friction JR. Myofascial pain syndrome. Characteristics and etiology. *In: FRICTON, J.R.; AWAD, E. (Ed.) Advances in pain research and therapy. New York: Raven Press; 1990. p. 107-27.*
29. Schiffman EL, Friction JR, Haley DP, Shapiro BL. The prevalence and treatment needs of subjects with temporomandibular disorders. *J Am Dent Assoc.* 1990; 120(3):295-303.
30. Rocha SS da, Mendonça J F, Alencar JR FGP. Estudo da prevalência dos fatores etiológicos em pacientes com dor miofascial orofacial. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2013; 36(1):41-6.
31. Dogan, M.; Doğan, D.O.; Duger, C.; Kol, I.O.; Akpınar, A.; Mutaf, B. *et al.* Effects of high-frequency bio-oxidative ozone therapy in temporomandibular disorder-related pain. *Medical Principles and Practice.* 2014; 23(6):507-10.
32. Daif ET. Role of intra-articular ozone gas injection in the management of internal derangement of the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 113(6):10-5.
33. Ge HY, Fernández-de-Las-Peñas C, Yue SW. Myofascial trigger points: spontaneous electrical activity and its consequences for pain induction and propagation. *Chin Med.* 2011; 6:13.
34. Menéndez S, Cepero BJ. Ozone therapy in cancer treatment: state of the art. *Ozone: Science & Engineering.* 2008; 2018:398-404.
35. Jesus CCL, Santos FC, Jesus LMOB, Monteiro I, Castro Santana MSSC, Trevisani VFC. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *PlosOne.* 2017;12(7):1-17.
36. Jacobs M. Accidents and typical complications in ozone therapy. *OzoNachrichten.* 1982; 1(5).
37. Schwartz A, Kontorschikova CV, Malesnikov OM *Guia para uso médico do ozônio.* 2. ed. Madrid; Rio de Janeiro; Associação Médica de Madrid; 2011.
38. Anzolin AP, Betol CD. Ozonioterapia como terapêutica integrativa no tratamento da osteoartrose: uma revisão sistemática. *Br J Pain.* abr-jun 2018;1(2):171-5.
39. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci.* 1999; 56:270-9.
40. Koca K, Yurttas Y, Bilgic S, Cayci T, Topal T, Durusu M *et al.*, Effect of Preconditioned Hyperbaric Oxygen and Ozone on IschemiaReperfusion Induced Tourniquet in Skeletal Bone of Rats. *Journal of Surgical Research.* 1010; 164:83-9.
41. Kosachenco B, Calliari C, Appel B, Mentz F, Malschitzky E. Efecto terapéutico de la ozonoterapia en la cicatrización de heridas en perros: Reporte de casos. *Ozone Therapy Global Journal.* 2018; 8(1): 197-210.

42. Borges GA, Elias ST, Silva SMM, Magaças PO, Macedo SB, Ribeiro APD *et al.* In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2017; 45(3): 364-70.
43. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*, Methuen. London & Co. Limited. 1960; 1(13):252-61.
44. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.* Mar 2018; 371(3):531- 539. doi: 10.1007/s00441-017-2785-7. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29383445; PMCID: PMC5820392.
45. Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav.* Nov 1999; 67(5):711-6.
46. Takahashi K, Taguchi T, Itoh K, Okada K, Kawakita K, Mizumura K. Influence of surface anesthesia on the pressure pain threshold measured with different sized probes. *Somatosens Mot Res.* Dec 2005; 22(4):299-305.
47. Soares LG, Marques AM, Guarda MG, Aciole JM, dos Santos JN, Pinheiro AL. Influence of the λ 780nm laser light on the repair of surgical bone defects grafted or not with biphasic synthetic micro-granular hydroxylapatite+Beta-Calcium triphosphate. *J Photochem Photobiol B.* Feb 2014; 131:16-23.
48. De Castro IC, Rosa CB, Carvalho CM, Aragão JS, Cangussu MC, Dos Santos JN, Pinheiro AL. Assessment of different energy delivery settings in laser and LED phototherapies in the inflammatory process of rat's TMJ induced by carrageenan. *Lasers Med Sci.* 2015; Nov 30(8):2105-13.
49. Fletcher D, Kayser V, Guilbaud G. Influence of timing on the analgesic effect of bupivacaine and epinephrine infiltration in carrageenan injected rats. *Anaesthesiology.* 1996; 84(5):29-37.
50. Favre-guilmaud C, Chabrier PE, Kalinichev M. Bilateral analgesic effects of botulinum toxin A (Dysport(®)) following unilateral administration in the rat. *Eur. J. Pain.* May 2017; 21(5):927-37.
51. Chou TC. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *British journal of pharmacology.* 2003; 136(6,):1146-1152.
52. Lorama LC, Fullera A, Cartmellac T, Mitchellb B, Mitchella D, Behavioural, histological and cytokine responses during hyperalgesia induced by carrageenan injection in the rat tail. *Physiology & Behavior.* 2007;96(5):873-80.
53. Andreula CF, Simonetti L, De Santis F, Agati R, Ricci R, Leonardi M. Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003 May; 24(5):996-1000.

54. Calunga Fernández JL, Parra TLR, Castillo P, Menéndez S, Carballo A, Céspedes J. Ozonoterapia combinada en el tratamiento del paciente portador de hernia discal lumbar: estudio preliminar. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2007; 26(1):80-6.
55. Saglam E, Alinca SB, Celik TZ, Hacisalihoglu UP, Dogan MA. Evaluation of the effect of topical and systemic ozone application in periodontitis: an experimental study in rats*. *Original Article*. 2019, Nov 28: 1-8.
56. Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Physiology & Behavior*. 1999; 186(4):853-9.
57. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, Van Rooijen N, Plonquet A et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007; 204 (5):1057-69.
58. Saclier M, Larbi SB, Ly HM, Moulin E, Mounier R, Chazaud B, Juban G. Interplay between myofibers and pro-inflammatory macrophages controls muscle damage in mdx mice. *J Cell Sci*. 2021; 134(18):189-97.
59. Di Filippo C, Luongo M, Marfella R *et al*. Oxigen/Ozone protects the heart from acute myocardial infarction through local increase of and NOS activity and endothelial progenitor cells recruitment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. Sep 2010; 382(3):287-91.
60. Arda I S, Kemal P, Cebrail G, Sayar I, Firat D, Yilmaz I et al. The effect of ozone and naringin on intestinal ischemia/reperfusion injury in an experimental model. *International Journal of Surgery*. 2015; 13(1):120-9.
61. Koca K, Yurttas Y, Bilgic S, Cayci T, Topal T, Umit K et al. Effect of Preconditioned Hyperbaric Oxygen and Ozone on Ischemia-Reperfusion Induced Tourniquet in Skeletal Bone of Rats. *Journal of Surgical Research*. Nov 2010; 164(1):83-9.
62. Huseyin O, Ekinçi S, Uysal B, Akyildiz F, Turkkan S, Ersen O et al. Evaluation and comparison of the effect of hypothermia and ozone on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle in rats. *Journal of Surgical Research*. Jun 2015; 196(2):313-9.
63. Somay H, Emon ST, Uslu S, Orakdogan M, Meric ZC, Ince U, & Hakan, T. The histological effects of ozone therapy on sciatic nerve crush injury in rats. *World Neurosurgery*. 2017; 105(6):702–8.
64. Hyde DM, Miller LA, McDonald RJ, Stovall MY, Wong V, Pinkerton KE, Wegner CD, Rothlein R, Plopper CG. Neutrophils enhance clearance of necrotic epithelial cells in ozone-induced lung injury in rhesus monkeys. *Am J Physiol*. Dec 1999; 277(6):1190-8.
65. Gebaska A, Olszanecki R, Korbut R. Endotoxaemia in rats: role of leukocyte sequestration in rapid pulmonary nitric oxide synthase-2. expression. *J. Physiol. Pharmacol*. 2005; 56: 299–311.

66. Kleinert H, Patz A, Linker K, Schwarz. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* Oct 2004; 500:255–66.
67. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr. Opin. Hematol.* 2006; 13:21–7.
68. Natan C. Points of control in inflammation. *Insight review articles*, 2002; 420 (6917): 846-52.
69. Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. *Current opinion in critical care*, 2001; 7(1):1-7.
70. Wenger, R. H.; Stiehl, D. P.; Camenisch, G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. Oct 2005:re12.
71. Touyz, R. M. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signaling* 2005; 7:1302–14.
72. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflammation Allergy*. Aug 2005; 4(4):471-9.
73. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res*. May 2006; 37(4):425-35.
74. Otterness IG, Wiseman EH, Gans DJ. A comparison of the carrageenan edema test and the ultraviolet light-induced erythema test as predictors of the clinical dose in rheumatoid arthritis. *Agents Actions*. Jun 1979; 9(2):177-83.

ANEXO



Comissão de Ética no Uso de Animais

Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da Ozonioterapia em Masseteres de Ratos em Modelo Experimental de Dor Inflamatória", protocolada sob o CEUA nº 5523240320 (ID 000146), sob a responsabilidade de **Marcio Cajazeira Aguiar e equipe: Luciana Lyra Casais e Silva; Kelvin Borges Rocha de Souza; Felipe Chaimsohn Gonçalves da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) na reunião de 15/05/2020.

We certify that the proposal "Effects of Ozone Therapy on Rat Masseters in an Experimental Model of Inflammatory Pain", utilizing 115 Heterogenics rats (115 males), protocol number CEUA 5523240320 (ID 000146), under the responsibility of **Marcio Cajazeira Aguiar and team; Luciana Lyra Casais e Silva; Kelvin Borges Rocha de Souza; Felipe Chaimsohn Gonçalves da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Bahia (Health Sciences Institute) (CEUA/ICS.UFBA) in the meeting of 05/15/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2020 a 02/2022** Área: **Ciências da Saúde**

Origem: **SUPRILAB SUPRIMENTO DE LABORATORIO E BIOTERIO LTDA**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **115**

Linhagem: **Wistar/Albino**

Peso: **200 a 250 g**

Local do experimento: Sala de cirurgia do Laboratório de Histotecnologia, Departamento de Biomorfologia, 1o andar, Instituto de Ciências da Saúde

Salvador, 21 de maio de 2020

Dr. Marcos Borges Ribeiro
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

Dra. Deboraci Brito Prates
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)