

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

TAICY SIGAKI DOS SANTOS

**ESTUDO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA ATRAVÉS DE SORO OZONIZADO
EM PERITONITES INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR**

UBERLÂNDIA – MG

2021

TAICY SIGAKI DOS SANTOS

**ESTUDO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA ATRAVÉS DE SORO OZONIZADO
EM PERITONITES INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR**

Projeto de pesquisa apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota

UBERLÂNDIA – MG

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA ATRAVÉS DE SORO OZONIZADO EM PERITONITES INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR

Pesquisa apresentada à banca examinadora como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II da graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 11 de Junho de 2021

Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Mônica Horr
Universidade Federal de Uberlândia

Dr. Murilo Vieira da Silva
Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meus pais, Marcia e Ubiratã, que sempre se dedicaram para que eu e meus irmãos tivéssemos acesso à educação de qualidade, e nos ensinaram que, através dela, mesmo que surgissem dificuldades, poderíamos chegar onde quiséssemos. Sempre incentivando e acreditando nos nossos sonhos, sem essa base hoje eu não estaria aqui. Agradeço também à minha avó Noêmia e à minha tia Valéria, que junto aos meus pais sempre me deram muito amor, e força para seguir meu caminho. Agradeço a todos os animais que já passaram e aos que ainda vão passar pela minha história, em especial minha cachorrinha Meg, minhas gatas Cindy, Fiona e Pandora, que a cada dia só me fazem ter mais certeza de que eu escolhi o caminho certo.

Agradeço a todos os meus professores que colaboraram para eu chegar até aqui. A Universidade Federal de Uberlândia, por todo ensinamento e experiência de vida, foi maravilhoso, tenho muito orgulho de tudo e sentirei saudade de cada momento.

Ao meu orientador, Francisco Cláudio Mota Dantas, por ter sido um excelente educador, e ter me ensinado sobre a área pela qual me apaixonei: cirurgia de pequenos animais, em especial a ortopedia. Obrigada pela amizade, pelo apoio, constante incentivo e auxílio, eu aprendi muito, e continuo aprendendo a cada dia, você é um excelente profissional e tem minha admiração.

Aos meus amigos Lana Gila, Helen Faria e Adriel Tavares, que sempre estiveram comigo nos momentos mais importantes. Da universidade para a vida.

E por fim, mas não menos importante, agradeço ao meu namorado Guilherme Scarafiz, que sempre esteve comigo e me apoiou desde o início, me dando forças e incentivo para buscar sempre o melhor. Se hoje eu sou alguém melhor que ontem, é porque você nunca soltou da minha mão.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O ozônio é uma molécula gasosa natural composta por três átomos de oxigênio em uma estrutura dinamicamente instável pela presença do efeito mesomérico, é um dos gases mais importantes da estratosfera, dada sua capacidade de filtrar os raios ultravioleta e, assim, garantir a manutenção do equilíbrio biológico na biosfera. Desde a Primeira Guerra Mundial tem sido utilizado para tratamentos médicos em função de suas propriedades antibacterianas, hemodinâmicas e anti-inflamatórias. No entanto, ainda faltam estudos para entender o efeito do ozônio na peritonite e propor maneiras seguras para a utilização do gás nestes casos. O presente estudo experimental teve como objetivo avaliar a ação da aplicação intraperitoneal de soro ozonizado, como tratamento da peritonite induzida experimentalmente em ratos Wistar. Para isso, foi realizada a inoculação intraperitoneal de suspensão fecal nestes animais. Estes foram divididos em grupos, nos quais cada um recebeu um tratamento diferente: solução Ringer Lactato intraperitoneal, solução Ringer Lactato ozonizada intraperitoneal, e o grupo controle (sem tratamento). Foi realizada análise de líquido cavitário em todos os grupos em dois momentos: 24 horas após inoculação de suspensão fecal, para confirmar que os animais estavam em um quadro de peritonite, e após 7 dias de estudo. Comparando esses dados chegamos ao resultado que de o grupo sem tratamento (controle) teve piora no quadro inflamatório com aumento de 7% das células inflamatórias, o grupo que recebeu solução Ringer Lactato intraperitoneal teve uma melhora com diminuição de 67% das células inflamatórias, e por fim o grupo que recebeu solução Ringer Lactato ozonizada intraperitoneal teve uma melhora mais significativa, com a uma redução de até 84,5% das células inflamatórias, chegando a um valor que, segundo a referência utilizada, não se enquadra em um quadro de peritonite. Conclui-se que o uso do soro ozonizado intraperitoneal, fora efetivo como tratamento experimental na peritonite induzida em ratos Wistar.

Palavras-chave: Ozônio; Peritonite experimental; Tratamento integrativo.

ABSTRACT

Ozone is a natural gas molecule composed of three oxygen atoms in a dynamically unstable structure due to the presence of the mesomeric effect. It is one of the most important gases in the stratosphere because of its ability to filter ultraviolet rays and thus ensure the maintenance of biological equilibrium in the biosphere. Since World War I it has been used for medical treatment as it possesses antibacterial, hemodynamic and anti-inflammatory properties. However, studies to understand the effect of ozone on peritonitis and to propose safe ways to use the gas in cases of peritonitis are still lacking. The present experimental study aimed to evaluate the action of ozone serum in the treatment of peritonitis in Wistar rats. For this, the induction of peritonitis was performed by intraperitoneal inoculation of fecal suspension in these animals. These were divided into 3 groups and each group received a different treatment: intraperitoneal saline, intraperitoneal ozonated saline and control (no treatment). Analysis of cavity fluid was performed in two distinct moments: 24 hours after the inoculation, which confirmed that all the animals were in the clinical condition of peritonitis, and after 7 days into the study, and by comparing this data we arrived at results that the group which was not receiving the treatment (control) had a worsening in the inflammatory condition with a 7% increase in inflammatory cells, the group that received intraperitoneal Ringer Lactate solution had an improvement with a 67% decrease in inflammatory cells, and finally the group that received intraperitoneal ozonized Ringer Lactate solution had a further significant improvement coming to a reduction of 84.5% of inflammatory cells, reaching a value that, according to the reference used, does not fit into the clinical condition of peritonitis. It was concluded that the use of intraperitoneal ozonized serum was effective as an experimental treatment in induced peritonitis in Wistar rats.

Key-words: Ozone; Experimental Peritonitis; Integrative Treatment.

INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Peritonite	12
2.1.1 Peritonite Primária e Secundária	12
2.1.2 Mecanismos Fisiopatológicos da Peritonite	13
2.1.3 Diagnóstico	14
2.1.3.1 Análise do Líquido peritoneal	15
2.1.3.2 Análise radiográfica e ultrassonográfica	15
2.1.4 Tratamento	15
2.2 Ozônio	16
2.2.1 Ozonioterapia	17
2.2.2 Ozonioterapia na Peritonite	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Anestesia	20
3.2. Indução da peritonite	21
3.3. Grupos experimentais	22
3.4. Obtenção de soro ozonizado	23
3.5. Obtenção do líquido cavitário	23
3.6. Eutanásia	25
3.7 Análises	25
3.7.1 Análise do líquido cavitário	25
3.8 Análises do resultado	26
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	35

INTRODUÇÃO

A peritonite em pequenos animais é caracterizada como uma severa complicação de afecções na cavidade abdominal, definida como uma inflamação no peritônio, cujo prognóstico é reservado e pode ter um curso fatal. (ZIMMERMANN et al., 2006).

Essa afecção pode se iniciar de diferentes formas, e por isso é classificada de acordo com o grau de contaminação, em séptica ou asséptica; ou com sua origem, em primária ou secundária. As causas mais comuns são procedimentos cirúrgicos, sendo 50% das peritonites sépticas decorrente da deiscência de pontos em órgãos ocultos submetidos a intervenção cirúrgica (BRAY, 1996); traumas que levam a ruptura de órgãos do trato digestório, ou urinário, e até mesmo reprodutor, como no caso de piometra (D'AVILA, 2012).

Grande parte dos casos de peritonite séptica evoluem para sepse, chegando a uma taxa de mortalidade de cerca de 50% (BENTLEY, 2013).

Os principais objetivos do tratamento operatório da peritonite são a eliminação da fonte de contaminação e limpeza da cavidade abdominal, com intuito de reduzir o número de microrganismos e suas toxinas, e remover substâncias que promovam o crescimento bacteriano (ROSMAN et al., 1999).

Atualmente, a ozonioterapia vem mostrando grande potencial para utilização médica por apresentar efeitos antioxidante, vasculares e modulação do sistema imune, tendo efeitos benéficos em diferentes patologias como: cardiovasculares, do tecido subcutâneo, de cabeça e pescoço, neurológicas, ortopédicas, gastrointestinais, geniturinárias, lesões isquêmicas, doença vascular periférica, entre outras (SMITH, 2017).

Existem diversas vias de administração do ozônio, e cada uma delas pode apresentar efeitos distintos em relação a sua finalidade inicial, por isso a via deve ser eleita de acordo com cada patologia, e deve ser utilizada corretamente para evitar efeitos indesejados. As possíveis vias de administração são: intravenosa, intra-arterial, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intrapleural, intra-articular,

intradiscal, intraforaminal, intralesional, uretral, intravesical, nasal, oral, vaginal, retal, tópica, e através de auto-hemoterapia maior e menor (BOCCI, 2005).

Alguns estudos acerca deste tema já foram realizados, comprovando que o ozônio tem efeito positivo em casos de peritonites, atuando como estimulante do sistema imunológico, normalizador do sistema de defesa, antioxidante e redutor da incidência de complicações graves e óbito (VASIL'EV et al., 1995; KUDRIAVTSEV et al., 1997; LABERKO et al., 2004; KOLESOVA et al., 2010; GADZHIEV et al., 2012).

Considerando os expostos, objetivou-se com este estudo experimental avaliar o efeito do soro ozonizado via intraperitoneal, no tratamento de peritonites induzidas experimentalmente em ratos Wistar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Peritonite

Peritonite é uma síndrome clínica caracterizada por sinais de inflamação, que ocorrem devido à irritação do revestimento da parede abdominal e visceral, que são, respectivamente, a membrana serosa parietal e a membrana serosa visceral, que juntas podem ser denominadas de peritônio (BELLAH, 2014).

Segundo Brocco et al. (2012) a peritonite é uma das causas mais importantes de sepse e morte nas salas de cirurgia e unidades de tratamento intensivo. Essa importância se dá devido à área do peritônio, que pode ser até 150% da superfície corporal (BACKER, 1998), fazendo com que uma inflamação seja muito extensa e com maior probabilidade de atingir a corrente sanguínea. Outro fator que torna o estudo dessa doença importante é que não existe um tratamento completamente eficaz, e o prognóstico é reservado de acordo com a etiologia e evolução. Como exemplo podemos citar a peritonite secundária, a qual sempre requer intervenção cirúrgica na cavidade abdominal (BRAY, 1996; CROWE Jr; BJORLING, 1998) pois se não tratada de forma adequada leva a alta taxa de mortalidade, por conta da grande chance de evoluir para sepse e insuficiência múltipla de órgãos (WONG et al., 2005).

2.1.1 Peritonite Primária e Secundária

A peritonite pode ser classificada em primária ou secundária, e ainda em séptica e não séptica, de acordo com sua etiologia. A primária representa menos de 1% dos casos, e ocorre quando microrganismos migram para a cavidade abdominal por via hematogena ou linfática (CROWE Jr; BJORLING, 1998; SWANN; HUGHES, 2000; BEAL, 2005). Normalmente, a peritonite primária é atribuída a infecções por coronavírus (FOSSUM et al., 2014), que em felinos é responsável pela peritonite

infeciosa felina (PIF).

A secundária é a forma mais comum em pequenos animais, com ocorrência de 37-85% no perioperatório de cirurgias gastrointestinais. No entanto, a peritonite secundária pode ocorrer por variadas causas (GRIMES, 2011), basta ter uma doença ou trauma que leve à contaminação bacteriana da cavidade abdominal.

Esta é a forma séptica, e 50% dos casos decorrem da deiscência de pontos em intervenções cirúrgicas em órgãos ocos (BRAY, 1996). Já a não séptica ocorre devido à presença de sangue, bile, urina, subprodutos do pâncreas, ou então invasão neoplásica; afinal todos estes fatores são irritativos ao peritônio; em alguns casos pode se tornar sépticas, quando a irritação/inflamação leva a uma lesão no intestino que permita a translocação bacteriana.

2.1.2 Mecanismos Fisiopatológicos da Peritonite

Inicialmente, o peritônio utiliza mecanismos imunológicos e funções de absorção para tentar controlar e manter a infecção localizada (BELLAH, 2014). Quando esse mecanismo inicial falha, ocorre uma inflamação generalizada, ocasionada pela presença de vários fatores pró-inflamatórios, como as interleucinas (IL), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), leucotrienos e tromboxanos; ocorre também a ativação do sistema complemento (C3a e C5a) e influxo de neutrófilos; logo em seguida, mastócitos e basófilos liberam seus grânulos de histamina, que levam ao aumento da permeabilidade vascular, que também é ocasionado por prostaglandinas e, como consequência, tem-se grande deslocamento e extravasamento de imunoglobulinas, fatores de coagulação, fibrina, fluidos e proteínas, sendo que a perda desses dois últimos pode levar a uma hipovolemia e hipoproteinemia (BELLAH, 2014). A hipoproteinemia pode facilitar a proliferação bacteriana abdominal (MAZZAFERRO, 2011), já a hipovolemia leva à diminuição da perfusão renal, ocasionando um acúmulo de toxinas, potássio e íons hidrogênio. Também ocorre diminuição da oxigenação tecidual, resultando em metabolismo anaeróbico com produção de ácido láctico. Por conseguinte, na tentativa de eliminar os íons de hidrogênio excedentes, o animal entra em um quadro de respiração compensatória, o qual, muitas das vezes, não é eficaz pela limitação física do

diafragma, excesso de fluido na cavidade peritoneal, e até mesmo restrição pela dor abdominal, e esses eventos podem culminar em um quadro de acidose metabólica significativa (PIRES, 2016).

A coagulação intravascular disseminada (CID) ocorre devido à lesão endotelial e ativação plaquetária, causada pela endotoxinas bacterianas e citocinas das células inflamatórias, que levam ao esgotamento dos fatores de coagulação, pela ativação generalizada da cascata, provocando trombose e fibrinólise (RAGETLY, 2011). Os trombos atingem vasos de variados calibres, interrompendo assim o suprimento sanguíneo de vários órgãos e agravando a agressão já existente, podendo culminar com o desenvolvimento da síndrome da disfunção múltipla de órgãos (SDMO), (BELLAH, 2014).

Segundo Bellah et al. (2014) é comum a ocorrência de sepse quando a origem da peritonite é bacteriana, em decorrência dos efeitos secundários dos patógenos e seus subprodutos, que complicam ainda mais as alterações já existentes.

2.1.3 Diagnóstico

Segundo Swayne (2012), a suspeita de peritonite séptica nos pequenos animais é baseada no exame físico, sinais clínicos e história pregressa. Mas sabemos que, para a confirmação é necessária a realização de testes diagnósticos. Em se tratando de pequenos animais, o teste mais usado é o exame citológico do fluido peritoneal (BELLAH, 2014), todavia os recursos de imagem, radiografia e ultrassonografia, podem auxiliar no diagnóstico (PIRES, 2016).

A realização de um hemograma completo, perfil bioquímico do soro, bem como do líquido peritoneal e perfil de coagulação, são fundamentais para dimensionar a gravidade da doença (BELLAH, 2014). Recomenda-se que, no perfil de coagulação, inclua-se tempo de protrombina e tempo parcial de tromboplastina, para identificação precoce de pacientes com alterações hemostáticas (RAGETLY et al., 2011).

2.1.3.1 Análise do Líquido peritoneal

De acordo com Pires (2016), em condições fisiológicas o líquido peritoneal é um transudato, e quando se tem peritonite ele passa a ser tipicamente caracterizado como um exsudato.

O líquido é coletado através de abdominocentese, de forma asséptica, e é realizada a análise citológica, na qual achados de neutrófilos degenerados com presença de bactérias intracelular são confirmatórios de uma peritonite séptica. A cultura bacteriana do líquido também pode ser realizada, inclusive em casos que na análise citológica não indicou presença de infecção, pois a ausência de bactérias só é confirmada através da cultura (BELLAH, 2014).

2.1.3.2 Análise radiográfica e ultrassonográfica

A peritonite geralmente leva à presença de líquido livre na cavidade abdominal, dificultando a visualização dos detalhes abdominais (STROM; PACCHIANA, 2007). Portanto, os exames de imagem são realizados para auxiliar no diagnóstico, buscando a identificação deste sinal, sendo que a ultrassonografia se mostra mais sensível neste quesito, pois detecta pequenas quantidades de líquido, com observação da presença de áreas anecóicas (escuras) separando estruturas abdominais, podendo assim auxiliar como guia para a abdominocentese, permitindo um diagnóstico precoce (RAGETLY et al., 2011). Já na radiografia, segundo Tobias e Johnsto (2013), é preciso ter pelo menos 8,8 mL/kg de fluido abdominal para o diagnóstico de derrame pleural ser consistente.

2.1.4 Tratamento

O tratamento da peritonite é baseado na estabilização sistêmica do paciente, e posterior localização e correção da causa base (ZIMMERMANN et al., 2006). Na estabilização do paciente é preconizada a fluidoterapia para a reposição da volemia e controle dos desequilíbrios ácido-base e eletrolíticos (DAYER et al., 2013).

Sabe-se que o tratamento do paciente com peritonite deve ser rápido, agressivo e preciso (FERRAZ; FERRAZ, 2005). Sendo o controle do foco infeccioso o principal fator que influencia na redução da mortalidade, e quanto mais cedo se inicia o tratamento, maiores as chances desse controle ser efetivo (ZIMMERMANN et al., 2006).

A lavagem da cavidade abdominal através da laparotomia exploratória é uma forma de tratamento preconizado, pois seu objetivo é identificar e remover a fonte de contaminação ou infecção, prevenir contaminação recorrente, remover corpos estranhos e fragmentos necróticos, e reduzir a carga bacteriana na cavidade abdominal, através da lavagem com solução salina ou Ringer Lactato aquecidos (HOUSE; BROCKMAN, 2004). Em conjunto, deve-se usar uma terapia antimicrobiana sistêmica, desde o período pré-operatório até ao pós-operatório, para auxiliar no combate da proliferação bacteriana (PIRES, 2016).

Em casos de sepse é ideal que o antibiótico seja selecionado por antibiograma, calculado em função da sua constante de eliminação (RAISER, 2005) e administrado de forma contínua, por 24h, mediante diluição em solução hidroeletrólítica, conforme a seguinte fórmula descrita por Zimmermann et al. (2006):

$$\text{Quantidade} = \text{peso do cão(kg)} \times \text{dose do antibiótico mg (kg)} \times \text{constante de eliminação} \times 24\text{h}$$

2.2 Ozônio

O ozônio (O₃) é um gás composto por três átomos de oxigênio em uma estrutura cíclica, é instável e possui uma meia-vida de 40 minutos à 20°C, sendo 10 vezes mais solúvel em água que o O₂ (oxigênio) (BOCCI, 2004). Esse gás está presente na atmosfera, sendo um dos mais importantes, dada sua capacidade de filtrar os raios ultravioletas (NOGALES, 2008).

Em 1840, um químico alemão, chamado Christian Friedrich Schönbein, trabalhava com eletrólise da água e durante o processo percebeu a formação de um gás com odor característico que foi descrito como “cheiro elétrico e pungente”, o qual nomeou “Ozon”, derivado do termo grego “Ozein” (aquele que emite cheiro) (RUBIN, 2001). O cheiro descrito por Schönbein pode ser percebido durante uma

tempestade, pois a descarga elétrica dos raios sobre o oxigênio atmosférico catalisa a formação de ozônio (BOCCI, 2005, 2006; ELVIS, 2011).

A formação do ozônio medicinal ocorre a partir da passagem do oxigênio puro por um gerador, que deve ser seguro e atóxico; esse oxigênio passa por um gradiente de alta voltagem (5-13 mV), no qual algumas moléculas de oxigênio são quebradas em átomos e esses acabam se unindo a uma outra molécula de oxigênio, formando então o gás ozônio (FERNÁNDEZ et al., 2007)

2.2.1 Ozonioterapia

Atualmente, a ozonioterapia é reconhecida e bem estabelecida em alguns países, estando disponível até em hospitais públicos, como é o caso da Rússia. Apesar desse reconhecimento, essa terapia é relativamente nova.

No Brasil, a fundação da Associação Brasileira de Ozonioterapia (ABOZ) se deu apenas em 2006, com o papel de legalizar a prática, informatizar e capacitar profissionais, com base em experiências realizadas no Brasil e exterior (ABOZ, 2006). Entretanto, apesar deste reconhecimento, o seu uso dentro da medicina veterinária ainda é restrito (ARAUJO, 2006).

O potencial dessa terapia se deve a seu efeito antioxidante, modulação do sistema imune, vascular e hematológico. Algumas dessas propriedades tem relação com a instabilidade e efeito oxidante do ozônio, que faz com que ele rapidamente retorne a forma molecular do oxigênio, mostrando-se como grande potencializador de reparação tecidual e indutor de neovascularização quando utilizado na forma medicinal (PENIDO; FERREIRA, 2010).

Além disso, o O_3 , por ser um gás instável, ao se degradar, retorna para sua forma estável (O_2) mais átomos livres de oxigênio (radicais livres), e esses, por serem altamente reativos, oxidam os vírus, bactérias, compostos orgânicos e inorgânicos que entrarem em contato (LAM, 2008). Por conseguinte, o ozônio tem sido considerado também um microbicida eficaz, com grande espectro de ação, devido ao fato de que vários trabalhos realizados demonstraram este poder microbicida, bactericida, vermícida, fungicida e parasiticida (CARDOSO et al., 2000; BARROS et al., 2001).

As vias de administração são múltiplas, como intravenosa, intra-arterial, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intrapleural, intra-articular, intradiscal, intraforaminal, intralesional, uretral, intravesical, nasal, oral, vaginal, retal, tópica, e através de auto-hemoterapia maior e menor. A via deve ser escolhida e utilizada corretamente para que não ocorram acidentes (BOCCI, 2005).

2.2.2 Ozonioterapia na Peritonite

Estudos demonstram que a utilização do ozônio teve um efeito positivo em casos de peritonite, agindo como estimulador do sistema imunológico, normalizador do sistema de defesa antioxidante, reduzindo a incidência de complicações graves e óbito (VASIL'EV et al., 1995; KUDRIAVTSEV et al., 1997; LABERKO et al., 2004; KOLESOVA et al., 2010; GADZHIEV et al., 2012).

Alguns autores se baseiam na avaliação da exposição prévia ao ozônio, como Schulz et al. (2003), que expôs ratos à insuflação peritoneal de ozônio por 5 dias, e logo após induziu peritonite através da inoculação intraperitoneal de suspensão fecal, obtendo como resultado mortalidade reduzida. Um estudo semelhante, de Rodríguez et al. (2009), demonstrou que os animais previamente expostos à insuflação peritoneal de ozônio tiveram o aumento de mecanismos protetores, como aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), aumento da glutatona peroxidase (GPx), e redução de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são marcadores de peroxidação lipídica. Estes animais também tiveram a injúria em órgãos atenuada, demonstrada pela baixa concentração sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatinina (CRE), e a baixa quantidade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar.

Bette (2006) utilizou ozonioterapia em ratos por via intraperitoneal (gás composto por 5% de ozônio e 95% de oxigênio no volume de 80ml/kg) durante 5 dias. Após este período, foi inoculada a suspensão fecal, e administrado antibiótico injetável – combinação de piperacilina e tazobactam (TZP). A pré-exposição ao ozônio apoiou a eficácia do TZP com alteração no estado imune dos animais, percebida através da contagem de células sanguíneas (aumento de células brancas, sobretudo linfócitos e granulócitos) e da expressão de citocinas pró-inflamatórias

(aumento de interleucina 1 beta – IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa – TNF- α).

Silva et al. (2009) avaliou a ação bactericida do ozônio e do dióxido de carbono (CO₂) no tratamento de peritonite em ratos. A peritonite foi induzida através da inoculação de 2 mL de *E. coli* ATCC na concentração de 10¹⁰ UFC e 1ml de sulfato de bário (BaSO₄) na cavidade peritoneal. A ozonioterapia pela via intraperitoneal foi realizada em concentrações diferentes (42 μ g/ml e 62 μ g/ml por 5 minutos). Alguns animais foram eutanasiados logo após o procedimento, nos quais foi evidenciado o maior efeito bactericida do ozônio, se comparado ao dióxido de carbono, sendo a concentração de 62 μ g/mL mais efetiva que a de 42 μ g/mL. Os outros animais foram observados por 24 horas, e nestes não foi percebida diferença no efeito bactericida entre os gases. Apesar do efeito bactericida do gás (sem efeitos tóxicos na dose testada), não houve influência na sobrevivência dos animais.

Erginel et al. (2014) induziu peritonite em ratos através da técnica de ligadura e punção cecal, dissecação cecal e anastomose íleo-cólica. Os animais foram submetidos à ozonioterapia através da via intraperitoneal (1 mL/kg/dia) durante sete dias. Após este período, os animais foram eutanasiados e realizou-se análises histopatológicas do cólon, níveis de hidroxiprolina (que refletem a quantidade de colágeno presente no tecido) e pressões de ruptura colônica. Os animais que receberam ozonioterapia apresentaram menores áreas de necrose e edema nos segmentos intestinais analisados, confirmando a redução da atividade inflamatória e a maior deposição de colágeno. Assim, constatou-se que a utilização de ozonioterapia após anastomose intestinal contribui para a cicatrização tecidual, e melhores resultados são obtidos se a utilização do ozônio se iniciar imediatamente após a intervenção cirúrgica. Porém, o grupo controle não recebeu placebo pela via intraperitoneal, portanto não se sabe se o stress causado pela manipulação diária tem alguma influência no resultado obtido.

Outro estudo semelhante, realizado por Çakir et al. (2016), induziu peritonite em ratos através da técnica de ligadura e punção cecal e anastomose colônica. Foi administrado ozonioterapia intraperitoneal (1 mL/kg/dia) durante três semanas e, sem seguida, os animais foram submetidos à eutanásia. Foram analisados os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), pressões de ruptura colônica e histopatologia de

amostras do cólon. Ficou constatado que a utilização de ozonioterapia após anastomose intestinal contribui para a cicatrização tecidual, afetando a proliferação e a vascularização, além de diminuir a resposta inflamatória (menores níveis séricos de TNF- α e IL-1 β), e prevenir o dano oxidativo (menores níveis de MDA e da atividade da MPO).

Todos estes estudos confirmaram o efeito bactericida do ozônio. No entanto, ainda faltam estudos para entender o efeito do ozônio na peritonite e propor maneiras seguras para a utilização do gás nestes casos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pela CEUA (Comissão De Experimentação Animal) UFU de acordo com o protocolo 001/20 (**Anexo I**).

Para este estudo foram utilizados 21 ratos Wistar, machos, com peso médio de 300 gramas e idade entre 12 e 15 semanas, fornecidos e mantidos na Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Os animais foram divididos de acordo com os grupos experimentais e permaneceram durante toda a fase experimental em micro-isoladores. O ambiente possui controle de temperatura (22 + ou - 2°C), luminosidade (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar. Água e ração previamente autoclavados oferecidos *ad libitum*.

3.1. Anestesia

Para a indução da peritonite e realização do tratamento diário os animais eram anestesiados com isoflurano, por meio do aparelho de anestesia inalatória digital, auto fluxo - Bonther. A indução anestésica foi realizada na caixa de indução (Figura 1) na concentração de 4% a 7%, e a manutenção por meio de máscara na concentração de 1,5% a 2%.

Figura 1 - Animal sendo anestesiado na caixa de indução.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

3.2. Indução da peritonite

Após serem anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, foi feita antissepsia com polivinilpirrolidona 2%, seguida de álcool-iodado 3% da região ventral do abdome, e em seguida realizada a coleta do líquido abdominal para análise citológica. Após essa manobra foi aplicado por via intraperitoneal no quadrante direito 1 mL de suspensão fecal (Figura 2) preparada na proporção de 2g:17ml (fezes/solução salina de NaCl 0,9%) assim como realizado por Brocco et al. (2012).

Para a padronização do inóculo transferido aos animais, foi realizada uma avaliação quantitativa do número de UFC/mL, usando três réplicas e três repetições de suspensões fecais, sendo determinada por meio da realização de diluições seriadas e semeadura em placas de ágar MacConckey e TSA (Ágar Triptona de

Soja).

Esse procedimento foi realizado com a suspensão fecal teste utilizada no momento da inoculação nos animais e comparada ao inóculo padronizado previamente. Foram utilizadas as fezes colhidas dos micro-isoladores das próprias cobaias, fazendo um pool com amostras de todos os grupos, foi usado 2 g de fezes retirados do pool, diluído com 17 mL solução salina de NaCl 0,9%. Para a administração da suspensão fecal foi utilizada seringa estéril descartável de 3 mL e agulha hipodérmica nas dimensões 40 mm x 12 mm.

Vinte e quatro horas após a aplicação da solução fecal foi realizada uma nova coleta de líquido abdominal para confirmar a presença de peritonite.

Figura 2 - Aplicação intra abdominal de solução fecal, para indução da peritonite.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021)

3.3. Grupos experimentais

Após a indução de peritonite os animais foram divididos em 3 grupos, com 7

animais cada: grupo tratado, controle positivo e controle. Receberam tratamento por 7 dias, as amostras foram coletadas no 8º dia após início do tratamento.

Grupo Tratado 7 dias (GT): os animais (n=7) receberam 20 mL de Ringer Lactato ozonizada na concentração de 50 mg/L por via intraperitoneal, diariamente, durante 7 dias.

Grupo controle positivo 7 dias (GCP): os animais (n=7) receberam 20 mL de Ringer Lactato por via intraperitoneal, diariamente, durante 7 dias. Grupo controle 7 dias (GC): os animais (n=7) após indução da peritonite não receberam nenhum tratamento, sendo submetidos a eutanásia no 8º dia

3.4. Obtenção de soro ozonizado

O conjunto elaborado para obtenção da solução Ringer Lactato ozonizada nas concentrações 50 mg/L, foi realizada através de gerador de ozônio (MODELO O&L 1.5RM; Ozone & Life), alimentado por a um cilindro de oxigênio portátil. Foi acoplada ao gerador uma bolsa de sistema fechado de solução Ringer Lactato de 500 mL através de um equipo macro gotas, formando um sistema de difusão de bolhas finas com a mistura O_2/O_3 durante 20 minutos.

3.5. Obtenção do líquido cavitário

Para coleta do líquido abdominal, após indução anestésica, os animais eram colocados em decúbito dorsal e submetidos à infusão de 20 mL solução salina NaCl 0,9% na cavidade abdominal, por meio de uma agulha 40mm x 12mm inserida no terço médio do abdome sobre a linha alba (Figura 3), após elevação da musculatura abdominal com uma pinça anatômica com dente, para evitar danos aos órgãos internos. Em seguida, o abdome era massageado por um minuto, e após este período o animal era colocado em decúbito ventral e a agulha retraída até a extremidade do abdome para auxiliar na coleta.

O material era coletado por gotejamento em microtubo tipo Eppendorf com volume de 1,5 mL (Figura 4), devidamente identificados e resfriados para transporte

e análise no laboratório de patologia animal.

Figura 3 - Animal recebendo infusão de solução salina na cavidade abdominal, para posterior recuperação.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

Figura 4 - Procedimento de abdominocentese para recuperação do líquido cavitário.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

3.6. Eutanásia

Os animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia no oitavo dia após a confirmação da peritonite, de acordo com os respectivos grupos experimentais, por aprofundamento da anestesia inalatória, seguido de deslocamento cervical após a parada respiratória.

3.7 Análises

3.7.1 Análise do líquido cavitário

Todos os animais foram submetidos à avaliação do líquido abdominal antes do da indução da peritonite, 24 horas após a aplicação da suspensão fecal, para a confirmação da peritonite, que foi considerada quando o número de neutrófilos degenerados fosse superior a 3000 por mililitros de líquido cavitário (ALLEMAN,2003).

As coletas e análises pós-tratamento foram realizadas depois de 8 dias após

confirmação da peritonite, de acordo com cada grupo.

As lâminas foram fixadas com metanol em no máximo 30 minutos após a coleta e coradas com May-Grunwald-Giemsa, e depois analisadas, quando fora realizada a contagem de neutrófilos degenerados.

3.8 Análises do resultado

Os dados foram apresentados sob a forma de estatística descritiva, utilizando-se média e desvio padrão para as variáveis paramétricas ou mediana e amplitude para as variáveis não paramétricas. Para verificar a normalidade de distribuição será realizada a análise dos histogramas e o teste de Shapiro-Wilk ($p \geq 0,05$). A comparação da mediana dos números de neutrófilos entre os tempos, dentro do mesmo grupo, foi realizada pelo teste de Wilcoxon. Ao passo que a comparação das medianas entre os grupos, foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis. Para ambos os testes foi considerado o valor de $p < 0,05$ como significância estatística.

4. RESULTADOS

Foi realizada a análise de líquido peritoneal, em todos os grupos, após 24 horas da indução da peritonite, calculou-se a mediana da contagem de neutrófilos de cada grupo, e esses valores foram comparados entre si (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre os valores de mediana dos respectivos grupos, após 24 horas da indução da peritonite, dita como tempo 0.

	Controle	Ringer Lactato	Ozônio	Valor de P
Tempo 0	16.900 (12.240 - 54.560) ^{ab}	32.781 (10.240-60.801) ^a	11.520 (9.600-27.840) ^b	0,0397

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

Cada grupo foi avaliado individualmente comparando os resultados da

contagem no dia zero (início da peritonite) e após 7 dias de estudo.

Comparação dos valores da mediana do grupo controle em diferentes dias (Tabela 2). É possível verificar um aumento de 7%.

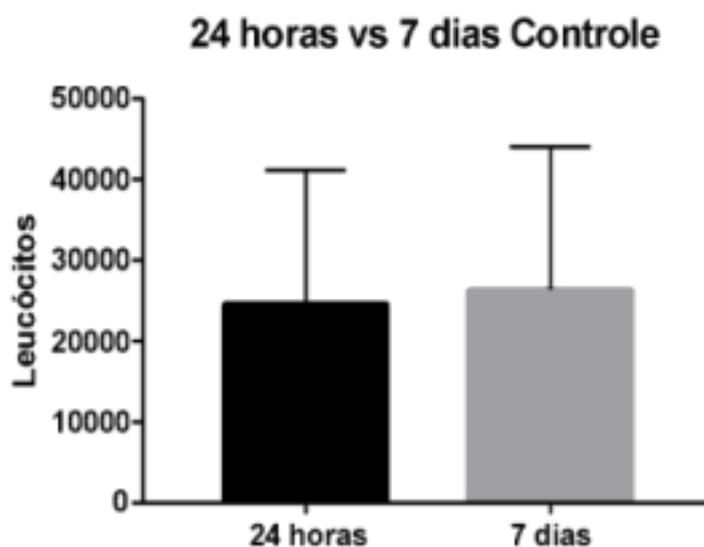
Tabela 2 - Grupo Controle

	24 horas	7 dias	Valor de p
Contagem de Neutrófilos	16.900 (12.240-54560)	18.083 (13.096-58.379)	0,0156

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

A comparação dos valores da média do grupo controle em diferentes dias (Gráfico 1), mostra um ligeiro aumento. O desvio padrão representado pela barra de erro mostra que há uma diferença entre os valores de um indivíduo para outro, ou seja, uma população heterogênea.

Gráfico 1 - comparação entre as médias do grupo controle em diferentes dias.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

Comparação dos valores da mediana do grupo Ringer Lactato em diferentes

dias (Tabela 3). É possível verificar uma redução de aproximadamente 67%.

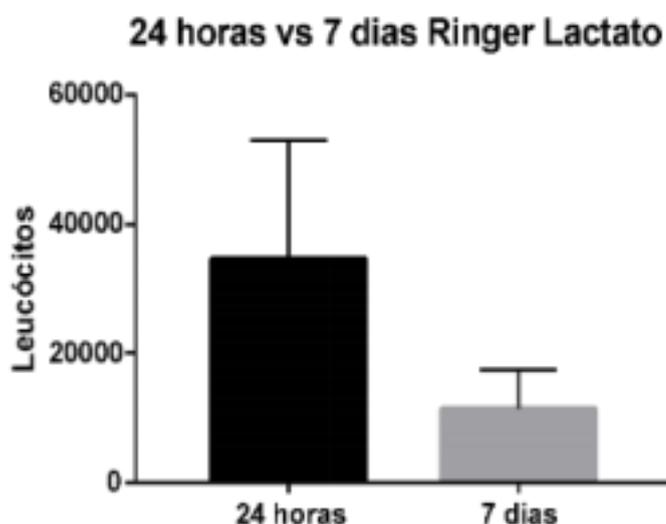
Tabela 3 - Grupo Controle positivo

	24 horas	7 dias	Valor de p
Contagem de Neutrófilos	32.781 (10.240-60.801)	10.817 (3.379-20.064)	0,0156

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

A comparação dos valores da média do grupo controle positivo em diferentes dias (Gráfico 2), mostra uma redução. O desvio padrão representado pela barra de erro, mostra que a população nas primeiras 24 horas era heterogênea, e após o 7 dias de estudo a redução ocorreu de forma homogênea.

Gráfico 2 - Comparação dos valores da média do grupo controle positivo em diferentes dias.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

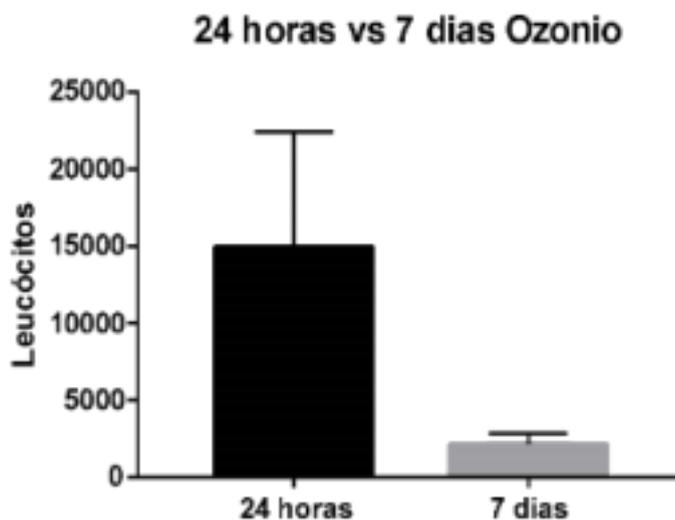
Comparação dos valores da mediana do grupo ozônio em diferentes dias (Tabela 4). É possível verificar uma redução de 84,5%.

Tabela 4 - Grupo Tratado

	24 horas	7 dias	Valor de p
Contagem de Neutrófilos	11.520 (9.600-27.8400)	1785 (1.440-3.270)	0,0156

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

A comparação dos valores da média do grupo tratado em diferentes dias (Gráfico 3), mostra uma redução significativa. O desvio padrão representado pela barra de erro, mostra que a população nas primeiras 24 horas era heterogênea, e após o 7 dias de tratamento a redução ocorreu significativamente em todos os indivíduos do grupo, tornando a população homogênea.

Gráfico 3 - Comparação dos valores da média do grupo tratado em diferentes dias.

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

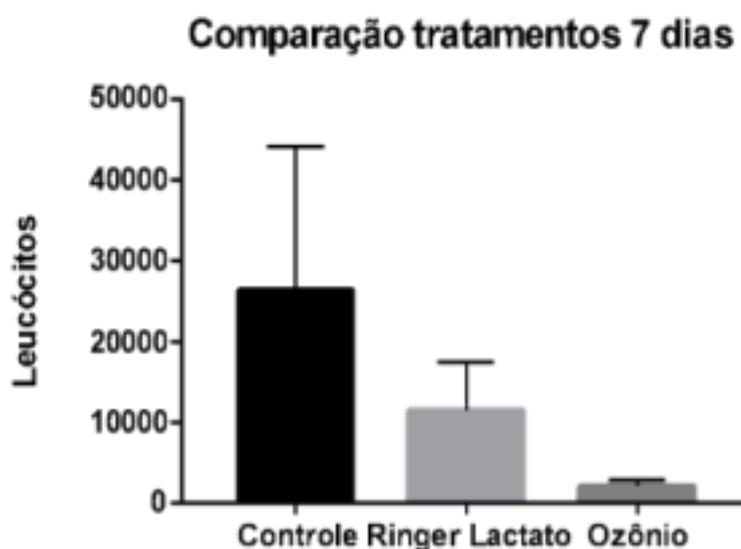
Após 7 dias de estudo foi realizada a análise de líquido peritoneal, em todos os grupos, calculou-se a mediana da contagem de neutrófilos de cada grupo, e esses valores foram comparados entre si (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre os grupos após 7 dias.

	Controle	Ringer Lactato	Ozônio	Valor de P
7 dias	18.083(13.096- 58.379) ^a	10.817 (3.379-20.064) ^a	1785 (1.440-3.270) ^b	<0,0001

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

Comparação entre os valores da média dos respectivos grupos (Gráfico 4), após 7 dias de estudo.

Gráfico 4 - Comparação dos valores das médias dos grupos após 7 dias de tratamento.

Fonte: Arquivo pessoal da autora (2021).

5. DISCUSSÃO

Buscou-se com este estudo explorar as funções microbicida e bactericida já conhecidas do ozônio, como tratamento na peritonite já instalada. Os grupos receberam a solução fecal preparada na proporção de 1:10 (fezes/solução salina de NaCl 0,9%) seguindo o padrão definido por Schulz et al. (2013), e tiveram líquido

cavitário colhido e analisado após 24 horas, para avaliação do número de neutrófilos degenerados presentes, e assim confirmação da peritonite, uma vez que um resultado acima de 3000 células por mililitros de líquido cavitário é considerado um quadro de peritonite (ALLEMAN, 2003).

Nesta análise o valor de p foi de 0,00397 mostrando-se como um resultado significativo.

Na análise das medianas dos três grupos, após as 24 horas, observamos que todos apresentaram resultados acima do valor mínimo definido, caracterizando assim a peritonite. Sabe-se que a resposta imune de cada indivíduo é única, e por esse motivo ocorrem variações no número de células que cada animal apresentou, o que gerou uma diferença entre as medianas do grupo controle positivo e o tratado com solução ozonizada, assim dissemos que os grupos (GCP) e (GT) se diferenciam estatisticamente, mas é válido lembrar que essa diferença não interferiu na pesquisa, pois nesta análise o valor de p foi de 0,00397 mostrando-se como um resultado significativo, além de que o resultado esperado era a presença da inflamação do peritônio, e foi alcançado em todos os animais.

Cada grupo teve suas medianas de 24 horas e após sete dias de tratamento comparadas, obteve-se um valor de p de 0,0156 para os três grupos, sendo assim, sabemos que essa diferença entre os dias, dentro de cada grupo, foi significativa em todos.

Na avaliação do grupo controle, foi possível verificar um aumento de 7% ($m_0=16.900/ m_7=18.083$) no número de células inflamatórias presentes no líquido cavitário após os sete dias de estudo. O que era esperado, já que sem receber nenhum tipo de tratamento o processo inflamatório continua instalado e evoluindo, e nesses casos o prognóstico é reservado, além de depender do sistema imune de cada animal conseguir ou não solucionar a infecção e inflamação. Temos na literatura que a taxa de sobrevivência em peritonites, dependendo da causa, pode variar de 52% a 79% (BELLAH, 2014).

Na avaliação do grupo controle positivo, que recebeu solução Ringer Lactato não ozonizada, foi observado uma redução de aproximadamente 67% ($m_0=32.781/ m_7=10.817$) no número de células inflamatórias presentes no líquido cavitário após

os sete dias de estudo. Esse resultado se deve ao fato de que a solução injetada diariamente, funciona como uma lavagem, diminuindo a carga bacteriana (ZIMMERMANN et al., 2008). Os estudos sobre essa técnica não afirmam com certeza o efeito benéfico e nem de sua inutilidade, pois ao passo que diminuem os microrganismos, a lavagem pode levar junto elementos de defesa do peritônio. Talvez por esse motivo usá-la como única forma de tratamento não melhora os resultados (CARNEIRO et al., 2002).

Quanto ao grupo tratado, que recebeu a solução de Ringer Lactato ozonizada, podemos observar uma redução de 84,5%, após sete dias de tratamento, e a média de contagem de neutrófilos degenerados, após o tratamento foi de 2132 (Gráfico 3), um valor abaixo do que consideramos ser peritonite. Esse resultado foi satisfatório e esperado, uma vez que conhecemos o potencial do ozônio, como uma molécula altamente reativa, que ao liberar radicais livres causa a oxidação de bactérias e vírus (LAM, 2008). Além disso, o ozônio é capaz de estimular e regular o sistema imune, que, segundo Anzolin e Bertol (2018), pode aumentar a produção de interferon e diminuir o fator de necrose tumoral e de interleucina-2, estimular a produção de citocinas, síntese de anticorpos, ativação de linfócitos T.

O mecanismo de ação antimicrobiano do ozônio se deve ao fato da oxidação de fosfolípidios e lipoproteínas presentes na membrana das bactérias, causando uma falha na integridade e consequente morte (ANZOLIN; BERTOL, 2018).

O estímulo de reparação tecidual e indução de neovascularização, que ocorre na ozonioterapia, são outros pontos-chaves para a recuperação do animal com peritonite (PENIDO; FERREIRA, 2010). Ocorre melhora da oxigenação tecidual, favorecendo o metabolismo celular, devido à vasodilatação que é estimulada pela produção de prostaciclina, e pela reação do ozônio com os ácidos graxos insaturados das membranas celulares, que estimulam a formação de substâncias que atuam na oxiemoglobina, disponibilizando oxigênio para os tecidos, favorecendo a reparação tecidual (HADDAD et al., 2009).

Por fim, comparando os resultados dos três grupos ao final dos sete dias, vemos que o grupo que recebeu a solução ozonizada foi o que apresentou melhores resultados, se diferenciando estatisticamente dos outros dois.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos, é possível identificar uma diminuição significativa da inflamação no modelo experimental estudado de peritonite induzida, tratado com solução ozonizada. Que possivelmente ocorreu devido à redução da carga bacteriana provocada pelo ozônio.

Este é um tratamento integrativo, reconhecido pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). O resultado obtido estimula a realização de outros estudos acerca deste tema, para entender melhor os mecanismos de ação, e assim poder aprimorar o uso do ozônio para esta finalidade.

REFERÊNCIAS

- ANSALONI, F. et al. Ozonized autohemotherapy: a new method to treat dairy cow acute interdigital phlegmon. Comparison with ceftiofur and oxytetracycline. **Ital. J. Anim. Sci.**, v. 1, p. 211-216, 2002. <https://doi.org/10.4081/ijas.2002.211>
- ANZOLIN, A.P; BERTOL, C.D. Ozone therapy as an integrating therapeutic in osteoarthritis treatment: a systematic review. **BrJP**. [online], v. 1, n. 2, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/2595-0118.20180033>>. Acesso em: 7 Junho 2021.
- ARAUJO, M. Ozonioterapia: Efectividad y riesgos. **Ministerio de Salud**. Chile, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONIOTERAPIA. 2019. Disponível em: <<http://www.aboz.org.br>>. Acesso em: 7 de junho de 2021.
- BACKER, A.E. et al. Quantitative assessment of independent contributions of pericardium and septum to direct ventricular interaction. **Am J Physiol**, 1998.
- BARROS, L.M. et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 15, n.1, p. 18-22, 2001. <https://doi.org/10.1590/S1517-74912001000100004>
- BEAL, M.W. **Approach to the acute abdomen. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.35, n.2, p.375-396, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.10.008>
- BELLAH, J.R. Peritonite. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos das Doenças em cirurgia de pequenos animais**. p.117-1253. Ed. São Paulo: Roca, 2014.
- BELLINI, L.; SEYMOUR, C.J. Effect of intraoperative constant rate infusion of lidocaine on short-term survival of dogs with septic peritonitis: 75 cases (2007-2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 248, n.4, p.422-429, 2016. <https://doi.org/10.2460/javma.248.4.422>
- BENTLEY, A.M. et al. Alterations in the hemostatic profiles of dogs with naturally occurring septic peritonitis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n.1, p.14–22, 2013. <https://doi.org/10.1111/vec.12013>
- BETTE, M. et al. Efficiency of tazobactam/piperacillin in lethal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O3/O2-pneumoperitoneum. **Shock**, v. 25, n. 1, p. 23-29, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000187983.56030.dd>
- BOCCI, V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of medical research**, v. 37, n. 4, p.425-435, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>

BOCCI, V.A.; **OZONE. A new medical drug**. 2^a ed. London: Springer 2005.

BOCCI, V.A. Can Ozonotherapy be Performed if the Biochemistry of the Process Cannot be Controlled? **Archives of Medical Research**, v.38, p.584-585, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.03.005>

BOCCI, V. A. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful, Mediators of Inflammation. **Spring Science**, v.13, n.1, p.3-11, 2004. <https://doi.org/10.1080/0962935062000197083>

BRAY, J. **Diagnosis and management of peritonitis in small animals**. In **Practice**, v.18, n.9, p.403-413, 1996. <https://doi.org/10.1136/inpract.18.9.403>

BROCCO, M.C. Histological features of peritoneal lavage with ropivacaine in rats with fecal peritonitis. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.27, n.2, p.193-199, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502012000200016>

ÇAKIR, T. et al. Effect of ozone on colon anastomoses in rat peritonitis model. **Acta cirurgica brasileira**, v. 31, n. 2, p. 111-118, 2016. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020160020000005>

CARDOSO, C.C. et al. Action of ozonized water in preclinical inflammatory models. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 1, p.51-54, 2000. <https://doi.org/10.1006/phrs.1999.0646>

CARNEIRO, B.G.M.C. et al. Estudo comparativo entre diversos tipos de tratamento para peritonite fecal em rato. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.29, n.1, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-69912002000100009>

CROWE Jr., D.T.; BJORLING, D.E. **Peritônio e cavidade peritoneal**. In: SLATTER, Douglas. Manual de cirurgia de pequenos animais. Cap. 34, p.499-528. São Paulo: Manole, 1998.

D'AVILA, G.F.L. **Peritonite em Cães**. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DAYER, T.; HOWARD, J.; SPRENG, D. Septic peritonitis from pyloric and non-pyloric gastrointestinal perforation: prognostic factors in 44 dogs and 11 cats. **The Journal of Small Animal Practice**, v.54, n.12, p.625-629, 2013. <https://doi.org/10.1111/jsap.12151>

ELVIS, A.M.; EKTA, J.S. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of natural science, biology, and medicine**, v.2, n.1, p.66-70, 2011. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.82319>

ERGINEL, B. et al. Effect of ozone therapy (OT) on healing of colonic anastomosis in a rat model of peritonitis. **Balkan medical journal**, v.31, n.3, p.249, 2014. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2014.13215>

FERNÁNDEZ, O.S.L. et al. Ozone Oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. **Journal compilation, European Society for Organ Transplantation**, n.21, p.39–48, 2008.

FERRAZ, B.A.A; FERRAZ, M.E. **Fisiopatologia da sepse**. In: MARTINS, N. Programa de atualização em uso de antibióticos em cirurgia. Rio de Janeiro: Diagraphic, v.1, n.2, 2005.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

GADZHIEV, N.D. et al. The influence of ozone therapy to some immunological parameters in patients with generalized peritonitis. **Klinichna khirurgiia**, n.7, p.34-36, 2012.

GRIMES, J.A. et al. Identification of risk factors for septic peritonitis and failure to survive following gastrointestinal surgery in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.238, n.4, p.486-494, 2011. <https://doi.org/10.2460/javma.238.4.486>

HADDAD, M.A. et al. Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]**, v.61, n.3, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000300003>

HOUSE, A.; BROCKMAN, D. Emergency management of the acute abdomen in dogs and cats. Surgical treatment. **In Practice, London**, v.26, n.10, p. 530-537, 2004. <https://doi.org/10.1136/inpract.26.10.530>

JUTKOWITZ, L.A. Reproductive emergencies. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.35, n.2, p.397-420, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.10.006>

KOLESOVA, O. E. et al. Correction of the antioxidative system during ozone therapy in peritonitis. **Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk**, n.5, p.34-39, 2010.

KUDRIAVTSEV, E.P. et al. Ozone therapy of diffuse peritonitis in the early postoperative period. **Khirurgiia**, n.3, p.36-41, 1997.

LABERKO, L.A. et al. Correction of enteral insufficiency syndrome in general peritonitis. **Khirurgiia**, n.9, p.25-28, 2004.

LAM, K.K.K. **Ozone Disinfection of SARS-Contaminated Areas**. p.1-6, 2008. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/doc/4894260/Ozone-disinfection-of-SARS-Contaminated-Areas-6pp>>. Acesso em: 7 Junho 2021.

MAZZAFERRO, E.M. **Blackwell's five-minute veterinary consult clinical companion: small animal emergency and critical care**. 2. Ed. USA:

Wiley-Blackwell, 2017.

NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. **Small animal diagnostic ultrasound**. 2. Ed. Philadelphia: Saunders. 2002.

NOGALES, C.G. et al. Ozone therapy in medicine and dentistry. **J Contemp Dent Pract**, v.9, n.4, p.75-84, 2008. <https://doi.org/10.5005/jcdp-9-4-75>

PENIDO, B.R.; LIMA, C.A.; FERREIRA, L.F.L. Aplicações da ozonioterapia na clínica veterinária, **PUBVET**, v. 4, n. 40, 2010.

PIRES, S.D.S. **Peritonite secundária a perfuração intestinal por ingestão de corpos estranhos em canídeos: A propósito de quatro casos clínicos**. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.

RAGETLY, G.R.; AVERY BENNETT R.; RAGETLY, C.A. Septic peritonitis: etiology, pathophysiology, and diagnosis. **Compendium**, 2011.

RODRÍGUEZ, Z.Z. et al. Preconditioning with ozone/oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with fecal peritonitis. **Inflammation Research**, v.58, n.7, p.371-375, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0001-2>

ROSMAN, C. et al. Local treatment of generalised peritonitis in rats; effects on bacteria, endotoxin and mortality. **The European Journal of Surgery**, v.165, n.11, p.1072-1079, 1999. <https://doi.org/10.1080/110241599750007928>

RUBIN, M.B. The History of Ozone. The Schönbeim Period, 1839-1868. **Bull Hist Chem**, v.26, n.1, p.40-56, 2001. <https://doi.org/10.1080/713780769>

SILVA, R.A. et al. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. **Acta cirurgica brasileira**, v.24, n.2, p.124-127, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502009000200009>

SCHULZ, S. et al. Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in lethal polymicrobial sepsis in rats. **European surgical research**, v.35, n.1, p.26-34, 2003. <https://doi.org/10.1159/000067032>

SMITH, N.L. et al. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical gas research**, v.7, n.3, p.212, 2017. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.215752>

STROM, A.M., PACCHIANA, P. What is your diagnosis? **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.230, n.4, p.505–506, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(00\)50041-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(00)50041-2)

SWANN, H.; HUGHES, D. Diagnosis and management of the peritoneal cavity. **Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice**, v.30, n.3, p.603-615, 2000.

SWAYNE, S.L.; BRISSON, B.; WEESE, J.S.; SEARS, W. Evaluating the effect of intraoperative peritoneal lavage on bacterial culture in dogs with suspected septic peritonitis. **The Canadian Veterinary Journal**, v.53 n.9, p.971-977, 2012.

TOBIAS, K.M.; JOHNSTO, S.A. **Veterinary surgery: small animal**. 2 Ed. Elsevier Health Sciences, 2013.

VASIL'EV, I.T. et al. The antibacterial and immunocorrective action of ozone therapy in peritonitis. **Vestnik khirurgii imeni Il Grekova**, v.154, n.3, p.56-60, 1995.

WONG, P.F. et al. Antibiotic regimens for secondary peritonitis of gastrointestinal origin in adults. In: Cochrane review abstracts. **The Cochrane Collaboration**, 2005. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004539.pub2>

ZIMMERMANN, M. et al. Peritonite em cães. **Ciência Rural [online]**, v. 38, n. 1, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000100053>

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Comissão de Ética na Utilização de Animais

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos da ozonioterapia por meio do soro ozonizado em peritonites induzidas em ratos wistar. ” protocolo nº **001/20 Francisco Cláudio Dantas Mota** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **18 de Setembro de 2020**.

(We certify that the project entitled “Efeitos da ozonioterapia por meio do soro ozonizado em peritonites induzidas em ratos wistar .”, **protocol 001/20**, under the responsibility of **Francisco Cláudio Dantas Mota** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of **September 18 th, 2020**).

Vigência do Projeto	Início: 30/10/20 Término: 30/10/21
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Rato heterogênico Wistar
Número de animais	48
Peso / Idade	300g / 12-15 sem
Sexo	Macho
Origem / Local	REBIR
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR

Uberlândia, 22 de Setembro de 2020.



Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenador da CEUA
Portaria Nº 1234, 01 DE OUTUBRO DE 2019