



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS DE*
CASCABEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PCF

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓLEO OZONIZADO COMO
COMPLEMENTO À TERAPIA MEDICAMENTOSA EM INFECÇÕES
CUTÂNEAS CAUSADAS PELA LEISHMANIOSE**

ISAAC LOREIRO CABRAL

CASCABEL
2022

ISAAC LOREIRO CABRAL

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓLEO OZONIZADO COMO
COMPLEMENTO À TERAPIA MEDICAMENTOSA EM INFECÇÕES
CUTÂNEAS CAUSADAS PELA LEISHMANIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli

CASCADEL - PR

2022

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

LOREIRO CABRAL, ISAAC

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓLEO OZONIZADO COMO COMPLEMENTO À TERAPIA MEDICAMENTOSA EM INFECÇÕES CUTÂNEAS CAUSADAS PELA LEISHMANIOSE / ISAAC LOREIRO CABRAL; orientador RAFAEL ANDRADE MENOLLI. -- Cascavel, 2022.

86 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. LEISHMANIOSE CUTÂNEA. 2. TRATAMENTO ALTERNATIVO. 3. OZONIOTERAPIA. I. ANDRADE MENOLLI, RAFAEL, orient. II. Título.

Dissertação revisada conforme as normas de redação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas por Silvana de Araújo Vaillões, RG nº 8.113.445-6/SSP-PR, revisora habilitada, graduada em Letras pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE/2007, Mestre em educação pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE/2014, Doutora em letras pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE/2022.

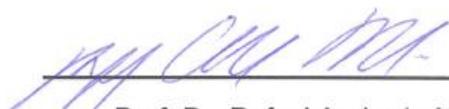
ISAAC LOREIRO CABRAL

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓLEO OZONIZADO COMO
COMPLEMENTO À TERAPIA MEDICAMENTOSA EM INFECÇÕES
CUTÂNEAS CAUSADAS PELA LEISHMANIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael A. Menolli

BANCA EXAMINADORA:

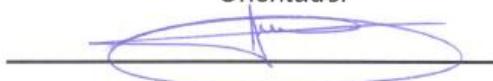


Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

UNIOESTE

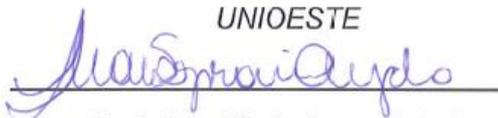
Orientador



Prof. Dr. João Paulo Arruda de Amorim

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

UNIOESTE



Prof. Dra. Thaís Scprani Ayala

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

UNIOESTE

Cascavel - PR

2022

BIOGRAFIA RESUMIDA

Isaac Loreiro Cabral, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascido em 27 de dezembro de 1987, graduou-se em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel, tendo finalizado o curso em 29 de junho de 2019 e colado grau em 13 de julho de 2019. Em março de 2020, iniciou as atividades como aluno do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas. Trabalha como Farmacêutico Responsável Técnico na empresa Farmácias Sauvel / D. Z. de Conto Batistus Comércio de Medicamentos Ltda, desde novembro de 2021 até o momento. Atualmente, desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientado pelo Dr. Rafael Andrade Menolli.

“Sua vida é a busca de uma eterna busca.
É o futuro que cria o seu presente.
Tudo é uma cadeia interminável de saudade.”

(Robert Frost, **Escapist - Never**, 1962)

A meu pai, Jacob Nunes Cabral (*in memoriam*), meu herói,
meu melhor amigo, que lá de cima me ilumina e me orienta
para que eu consiga seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Nessa ocasião especial, quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

A **Deus**, por me guiar, iluminar e dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos.

A meu pai, **Jacob Nunes Cabral**, eu agradeço e dedico este trabalho. Obrigado, pai, por tudo que fez por mim. Por ter sido essa pessoa honesta, correta e que, em nenhum momento, desviou dos seus objetivos. Você foi um exemplo de vida e cada segundo que passou ao meu lado será para mim eternizado.

À minha **mãe**, meus **irmãos** e **sobrinhos**, pelo respaldo familiar e por todo o incentivo na minha vida.

À minha namorada, **Paula de Moura**, minha companheira e incentivadora, que, muitas vezes, segurou a barra para que eu pudesse me dedicar aos meus objetivos, dando confiança e força para seguir em frente.

Ao meu orientador e grande amigo, Dr. **Rafael Andrade Menolli**. Obrigado, mestre, por compartilhar o seu conhecimento, o seu tempo e a sua experiência. Também, pela amizade, humildade, dedicação e respeito por mim. Você foi um dos grandes responsáveis para que eu conseguisse concluir esse trabalho e essa etapa na minha vida profissional.

À professora, Dra. **Thaís Soprani Ayala**, por ter aceitado o meu convite para compor a banca examinadora, por toda ajuda prestada neste trabalho e no nosso dia a dia no laboratório.

Ao professor, Dr. **João Paulo de Arruda Amorim**, por ter aceitado o meu convite para correção do meu trabalho, por toda a sua simpatia e seus conhecimentos compartilhados durante as pesquisas no laboratório de Histologia da UNIOESTE.

À **Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)** e ao **Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PCF)**, por toda estrutura fornecida para desenvolvimento deste trabalho.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓLEO OZONIZADO COMO COMPLEMENTO À TERAPIA MEDICAMENTOSA EM INFECÇÕES CUTÂNEAS CAUSADAS PELA LEISHMANIOSE

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose cutânea é uma doença crônica que atinge milhares de pessoas anualmente, possuindo um tratamento difícil, tanto pelo tempo elevado para cicatrização quanto pela alta toxicidade das drogas utilizadas para esse processo. O ozônio tem ganhado espaço na medicina, sendo utilizado atualmente como adjuvante em alguns tratamentos devido à atividade imunomodulatória e cicatrizante que possui. **OBJETIVO:** Este trabalho propõe o uso da terapia com o óleo de girassol ozonizado como auxiliar para o tratamento padrão das lesões cutâneas provocadas por *Leishmania amazonensis* em modelo experimental. **METODOLOGIA:** 30 camundongos BALB/c (CEUA nº 01/21) foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (G1, G2, G3, G4 e G5). Os grupos 1, 2, 3 e 4 foram infectados com *L. amazonensis*, na pata posterior direita. O grupo G5 serviu como controle não infectado no estudo. Os tratamentos duraram 30 dias. O Grupo G3 recebeu tratamento com medicamento de referência (Glucantime®) durante o período e o Grupo G1 recebeu Glucantime® mais a aplicação tópica do óleo ozonizado. O Grupo G2 recebeu somente óleo ozonizado na pata e o Grupo G4 não recebeu tratamento (controle positivo da lesão). A cada 10 dias de tratamento, foi realizada a mensuração, registros fotográficos das lesões, contagem de leucócitos sanguíneos e esfregaço em lâmina para análise do diferencial dos leucócitos. No final do tratamento, os animais foram eutanasiados, sendo coletados: sangue em punção cardíaca para contagem de leucócitos e ensaios sorológicos; macrófagos peritoneais e células totais do linfonodo poplíteo para análise da produção de citocinas e óxido nítrico; a pata lesionada foi dividida em 4 segmentos, a fim de avaliarmos os achados histológicos, biomarcadores de stress oxidativo, presença de parasitas na lesão (cultura) e a imunodeteção de proteínas por Western Blotting. **RESULTADOS:** O óleo de girassol demonstrou ser um ótimo veículo, sendo que a concentração do ozônio praticamente não varia durante os 30 dias de tratamento. Na análise *in vitro*, a concentração de 160 µg/mL do óleo ozonizado obteve o mesmo efeito do Glucantime®, não havendo detecção de parasitas em nenhum dos dias analisados. Os grupos tratados com Glucantime® (com e sem ozônio) apresentaram, nos achados histológicos, ausência de lesão ativa, com cicatrização evidente. Assim, o óleo ozonizado atuou como um adjuvante sinérgico ao Glucantime® no tratamento de lesões causadas pela leishmaniose em modelo animal.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose cutânea, tratamento alternativo, ozonioterapia.

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF OZONATED OIL AS A COMPLEMENT TO DRUG THERAPY IN SKIN INFECTIONS CAUSED BY LEISHMANIASIS

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cutaneous leishmaniasis is a chronic disease that affects thousands of people annually, with complex treatment, due to a long time for healing and the high toxicity of the drugs used for this process. Ozone has gained space in medicine and is used as an adjuvant in treatments showing immunomodulatory and healing activity. **OBJECTIVE:** This study proposes using ozonated sunflower oil therapy to aid in the standard treatment of skin lesions caused by *Leishmania amazonensis* in an experimental model. **METHODOLOGY:** 30 BALB/c mice (CEUA n° 01/21) were randomly distributed into five groups (G1, G2, G3, G4, and G5). Groups 1, 2, 3, and 4 were infected with *L. amazonensis* in the right hind paw. The G5 group served as an uninfected control in the study. The treatments lasted 30 days. Group G3 received treatment with a reference drug (Glucantime®) during the period, and Group G1 received Glucantime® plus topical application of ozonated oil. Group G2 received only ozonated oil in the paw, and Group G4 received no treatment (positive control of the lesion). Every ten days of treatment, measurements and photographic records of the lesions, blood leukocyte count, and slide smear were performed to analyze the leukocyte differential. At the end of the treatment, the animals were euthanized and collected: blood by a cardiac puncture for leukocyte count and serological assays; peritoneal macrophages and popliteal lymph node cells for analysis of cytokine and nitric oxide production; and the injured paw was divided into four segments, in order to evaluate the histological findings, oxidative stress biomarkers, presence of parasites in the lesion (culture) and immunodetection of proteins by Western Blotting. **RESULTS:** Sunflower oil proved an excellent vehicle, with ozone concentration practically unchanged during the 30 days of treatment. In the *in vitro* analysis, the concentration of 160 µg/mL of the ozonated oil had the same effect as Glucantime®, with no detection of parasites on any of the days analyzed. The groups treated with Glucantime® (with and without ozone) showed no active lesion in the histological findings, with evident healing. Thus, the ozonated oil acted as a synergistic adjuvant to Glucantime® in treating lesions caused by leishmaniasis in an animal model.

KEYWORDS: Cutaneous leishmaniasis, alternative treatment, ozone therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 LEISHMANIOSES.....	21
1.2 TRATAMENTO.....	24
1.3 OZÔNIO TERAPIA.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	33
3.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO OZONIZADO.....	33
3.3 MANUTENÇÃO DOS PARASITAS.....	33
3.4 ANIMAIS.....	34
3.5 PROCEDIMENTAL EXPERIMENTAL.....	34
3.6 INOCULAÇÃO DOS PARASITAS.....	34
3.7 ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO.....	34
3.8 MENSURAÇÃO DA LESÃO.....	35
3.9 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS.....	35
3.10 ANÁLISE DA PATA LESIONADA.....	35
3.11 CULTURA DA PATA LESIONADA.....	36
3.12 ANÁLISE DAS VIAS INFLAMATÓRIAS POR WESTERN BLOT.....	37
3.13 BIOMARCADORES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
3.14 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS.....	38
3.15 OBTENÇÃO DE LINFONODOS POPLÍTEOS.....	39
3.16 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	39
3.17 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	40

3.18	HISTOLOGIA.....	40
3.19	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	41
3.20	ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i>	41
3.21	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	DOSAGEM DO ÓLEO OZONIZADO.....	44
4.2	ANÁLISE <i>IN VITRO</i> DA RECUPERAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS A PARTIR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS.....	46
4.3	ESPESSURA DAS LESÕES.....	48
4.4	CULTURA DE PROMASTIGOTAS DA PATA.....	51
4.5	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	52
4.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TECIDUAL.....	59
4.7	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SISTEMICOS E LOCAIS SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	61
5.	CONCLUSÃO.....	69
6.	REFERÊNCIAS.....	71
7.	ANEXOS.....	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formas morfológicas de *Leishmania sp.* a) Promastigotas de cultura de *Leishmania sp.*; b) Amastigotas de *Leishmania sp.* em raspagem de tecido corado com Giemsa.....21
- Figura 2:** Ciclo de vida da *Leishmania*.....22
- Figura 3:** Dosagem da concentração de ozônio em $\mu\text{g/ml}$ no óleo de girassol comercial durante 30 dias.....45
- Figura 4:** Análise morfológica das patas durante o tratamento. Foi selecionado aleatoriamente as fotos de um camundongo por grupo, comparando e acompanhado a evolução do tratamento entre os dias 0, 10, 20 e 30.....49
- Figura 5:** Espessura das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, em milímetros.....51
- Figura 6:** Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E no aumento de 100x.....54
- Figura 7:** Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E no aumento de 400x.....55

Figura 8: Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por tricrômico de Masson no aumento de 100x.....56

Figura 9: a) Espessura da epiderme das lesões de patas infectadas com *L. amazonensis* de animais infectados e tratados (G1, G2 e G3), infectados e não-infectados (G4) e não-infectados (G5). b) infiltrado celular na derme de lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos infectados e tratados (G1, G2 e G3), infectados e não-infectados (G4).....59

Figura 10: Biomarcadores de estresse oxidativo em patas infectadas por *L. amazonensis* de camundongos BALB/c tratados ou não.....60

Figura 11: Número de leucócitos sanguíneos de camundongos infectados com *L. amazonensis* no início (a) e após trinta dias de tratamento (b).....62

Figura 12: Número de leucócitos sanguíneos e avaliação do tipo de célula sanguínea de camundongos infectados com *L. amazonensis* no dia 10 e após 30 dias de tratamento.....63

Figura 13: Análise da produção de óxido nítrico por dosagem de Nitrito por macrófagos peritoneais e dos linfonodos poplíteos.....65

Figura 14: Dosagem das citocinas IFN- γ (esquerda) e IL-4 (direita) do sobrenadante de células totais obtidas de linfonodos drenantes das patas infectadas com *L. amazonensis* em animais Balb/C após 30 dias de tratamento.....66

Figura 15: Dosagem das citocinas TNF- α (esquerda) e IL-10 (direita) do sobrenadante de macrófagos peritoneais obtidos dos animais infectados com *L. amazonensis* em animais Balb/C após 30 dias de tratamento.....67

Figura 16: Análise da via de sinalização das MAPK em homogenato de patas infectadas com *L. amazonensis* após 30 dias de tratamento.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da dosagem da concentração de ozônio no óleo de girassol comercial durante 30 dias, utilizando a titulação iodométrica.....44

Tabela 2: Formas promastigotas ($\times 10^3/\text{mL}$) de *L. amazonensis* encontradas após 48, 120 e 312h, no sobrenadante de macrófagos infectados com o parasita e tratados com óleo ozonizado nas concentrações 10, 20, 40, 80 e 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Glucantime® na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$; óleo não ozonizado e somente Meio 199.....46

Tabela 3: Diluição da cultura de fragmentos das patas infectadas com *L. amazonensis* em meio 199.....52

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

B.O.D.: *Biochemical Oxygen Demand*

CCMF: Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas

CEUA: Comitê de Ética da Utilização de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Cl₅₀: Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo

DMSO: Dimetilsulfóxido

ELISA: *Enzyme lynked immunosorbent assay*

Eppendorf: Tubo para micro centrífugas da marca Eppendorf

EROs: Espécies Reativas do Oxigênio

GAPDH: Gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase

H&E: Coloração Hematoxilina - Eosina

IFN- γ : Interferon Gama

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

KOH: Hidróxido de Potássio

LIAU: Laboratório de Imunologia Aplicada da Unioeste

LC: Leishmaniose Cutânea

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LT: Leishmaniose Tegumentar

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose Visceral

LVA: Leishmaniose Visceral Americana

LPS: Lipopolissacarídeos

MAPK: Proteínas Quinase Ativadas por Mitógenos

MO: Microrganismos

MP: Macrófagos Peritoneais

MTT: 3-metil-[4-5-8-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NF-κB: Fator Nuclear Kappa Beta

NO: Óxido Nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Solução salina tamponada com fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PBS-T: Solução salina tamponada com fosfato com acréscimo de Tween 20

PCF: Programa de Ciências Farmacêuticas

PVPI: Iodopovidona

Q.S.P.: Quantidade Suficiente Para

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

Sb5+: Antimoniais Pentavalentes

SEM: Erro Padrão da Média

SFB: Soro Fetal Bovino

SLA: Antígeno Solúvel de *Leishmania amazonensis*

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral Alfa

UNIOESTE: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

LISTA DE SIGLAS

®: Marca registrada

µg: Micrograma

mL: Mililitro

µL: Microlitro

µM: Micro Molar

nm: Nanômetro

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

O₃: Gás Ozônio

p/v: Peso por volume

v/v: Volume por volume

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

Leishmanioses são doenças parasitárias geralmente de caráter zoonótico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Esses parasitos digenéticos são transmitidos ao homem pela picada da fêmea infectada do inseto vetor, pertencente aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (LAINSON; RANGEL, 2005). Esse hospedeiro transmissor é um inseto piloso de coloração clara, conhecido popularmente como mosquito palha, birigui, cangalha, tatuíra ou, ainda, como *sandfly* (MARZOCHI; SCHUBACH; MARZOCHI, 2001).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas evolutivas em seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. A primeira é encontrada no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado; são as formas infectantes para mamíferos; e a segunda vive e se prolifera em macrófagos e monócitos de vários tecidos, no chamado sistema fagocítico mononuclear (GONÇALVES, 2018; REY, 2001).

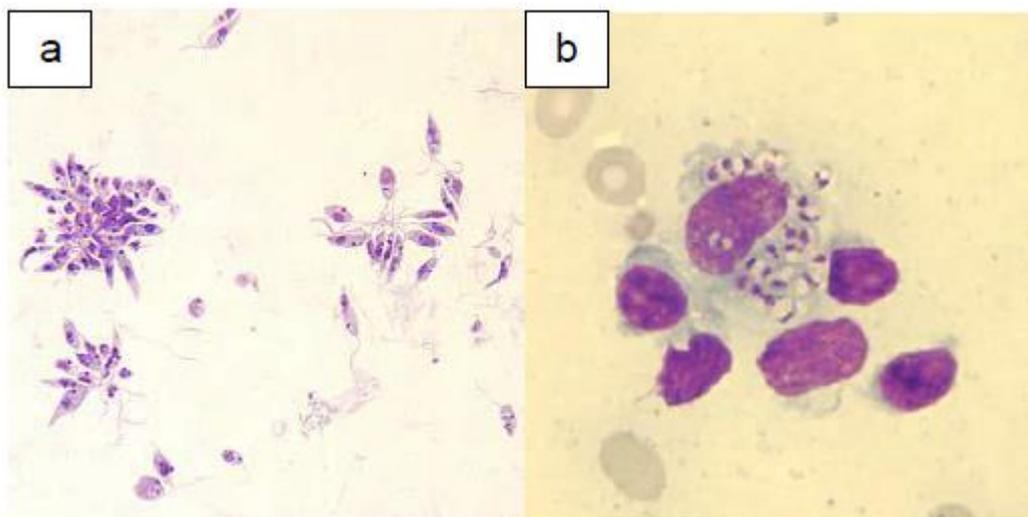


Figura 1: Formas morfológicas de *Leishmania* sp. a) Promastigotas de cultura de *Leishmania* sp.; b) Amastigotas de *Leishmania* sp. em raspagem de tecido corado com Giemsa. Fonte: CDC's Division of Parasitic Diseases. Disponível em: Image gallery <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>> Acesso em 20/11/2022.

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2020), os flebotomíneos fêmeas infectados ao se alimentar inoculam formas promastigotas no hospedeiro, que, por sua vez, são fagocitados por macrófagos e outros tipos de células mononucleares fagocíticas. No interior desses fagócitos, os promastigotas transformam-se em amastigotas, que se multiplicam por divisão simples, causando a lise da parede celular,

extravasamento desses parasitas, sendo novamente fagocitada por outras células. A patogenicidade do parasita, o estado imunológico do hospedeiro e outros fatores afetam se a infecção se torna sintomática e se resulta em leishmaniose cutânea ou visceral. Os flebotomíneos são infectados pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo. Nesses vetores, as amastigotas transformam-se em promastigotas, desenvolvem-se no intestino e migram para a tromba. Conclui-se, dessa forma, o ciclo de vida da *Leishmania*, como pode ser visualizado na Figura 2.

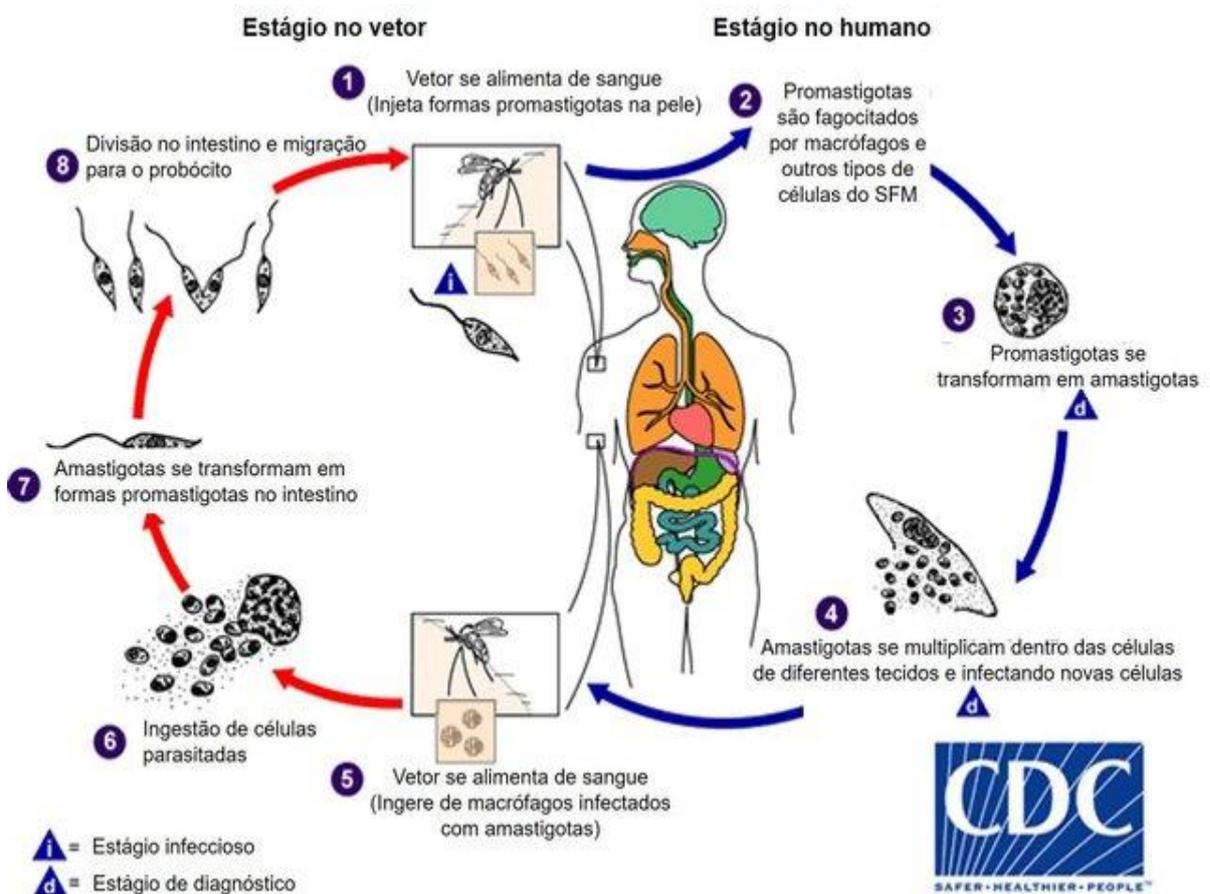


Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania*.

Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC 2020).

As leishmanioses são amplamente distribuídas pelo mundo afetando aproximadamente 12 milhões de pessoas em pelo menos 88 países. As manifestações clínicas são variadas, dependem do grau de comprometimento sistêmico e da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (REITHINGER *et al.*, 2007). Cerca de 95% dos casos de Leishmaniose cutânea (LC) ocorrem

nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2020, mais de 85% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Líbia, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia. Estima-se que ocorram entre 600.000 a 1 milhão de novos casos anualmente em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Corresponde à segunda doença de maior importância no mundo causada por protozoários, estando entre as 11 doenças infecto-parasitárias mais prevalentes (GUERRA *et al.*, 2018).

Manifestam-se clinicamente em três formas: a cutânea, a cutaneomucosa e a visceral. As formas cutânea e cutaneomucosa são chamadas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), bem como a forma visceral é denominada Leishmaniose Visceral Americana (LVA) (CASAGRANDE; GUIMARÃES, 2019).

A leishmaniose visceral é a forma mais grave das leishmanioses. Embora a maioria das infecções com as espécies visceralizantes seja assintomática, a taxa de letalidade da leishmaniose visceral sintomática é 100% dentro de dois anos de infecção, se não tratada. Leishmaniose visceral é uma doença sistêmica causada pela disseminação de *Leishmania* para o baço e fígado, que resultam em episódios de febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia (MURRAY *et al.*, 2005).

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum das leishmanioses e causa lesões muitas vezes desfigurantes, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes para toda a vida e/ou grave incapacidade. Começa como uma pápula no local da picada do mosquito e desenvolve-se um nódulo duro ou uma úlcera aberta infiltrada, que pode, ou não, curar-se espontaneamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) desenvolve-se como uma complicação da LC, com parasitas disseminando-se através do sistema linfático para colonizar as mucosas. Pacientes com LMC sofrem de úlceras destrutivas da mucosa, o que deixa os indivíduos afetados permanentemente desfigurados e propensos a comprometimento respiratório, infecções bacterianas secundárias e desnutrição (MURRAY *et al.*, 2005).

O gênero *Leishmania* compreende cerca de 21 espécies patogênicas aos humanos, sendo que, no Brasil, entre as espécies causadoras da forma

cutânea da doença, seis pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*, sendo as principais: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. Recentemente, foram também apontadas como agentes causadores da LC, no país, as espécies: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*. Em contrapartida, a espécie causadora da leishmaniose visceral nas Américas é a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (TRAVI *et al.*, 2018; LESSA *et al.*, 2007; GUEDES; CARVALHO; MELO, 2008).

No Brasil, verifica-se um aumento no número de casos da LTA registrados a partir da década de 1980, variando de 3.000 casos, no ano de 1980, a 35.748 casos, em 1995. Após a solidificação da implantação das ações de vigilância e controle da LTA no País (1985), observaram-se picos de transmissão a cada cinco anos. Registrou-se uma média anual de 25.763 casos novos, no período de 1995 a 2014, acarretando uma média de 14,7 casos/100 mil habitantes. Em 1995, verificou-se o coeficiente mais elevado dessa patologia no ano, quando atingiram 22,94 casos a cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2017).

Apesar do esforço da Organização Mundial da Saúde (OMS) para tornar o tratamento mais acessível, o sistema de saúde fraco de países endêmicos e a complexidade das leishmanioses, com variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão, a característica dos hospedeiros reservatórios, manifestações clínicas, as diferentes respostas à terapia e as múltiplas espécies de *Leishmania* circulantes na mesma área geográfica dificultam o controle dessas doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

1.2 Tratamento

O sucesso do tratamento envolve vários fatores, tais como: fatores do hospedeiro, como genética, resposta imune e apresentação clínica da doença; recursos de tratamento, tais como qualidade da droga, dosagem, duração e conclusão da terapia; e características do parasita, como sensibilidade intrínseca da espécie e falta de resistência ao medicamento (SUNDAR & SINGH, 2016).

Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das

leishmanioses, em suas diferentes formas, são os antimoniais pentavalentes ($Sb5^+$), a exemplo do antimoniato de meglumina (Glucantime®); no entanto, apresentam várias restrições para o uso devido aos seus graves efeitos colaterais, além de um grande índice de resistência em alguns casos (RATH *et al.*, 2003; AMEEN, 2010).

Medicamentos de segunda escolha, como a anfotericina B, são utilizados quando os $Sb5^+$ não podem ser administrados, porém, também apresentam alta toxicidade. Miltefosina, um inibidor da biossíntese de alquilfosfolipídios (pela inibição da enzima glicossomal acilcoenzima A aciltransferase no parasita) e indutor de apoptose, foi inicialmente utilizado como fármaco antitumoral e está licenciado em Portugal, Alemanha e Colômbia como o primeiro medicamento oral para o tratamento da leishmaniose visceral. Foi comprovada para esse medicamento uma eficácia de cerca de 98%, sendo que, até o momento, os efeitos adversos detectados são considerados mínimos e é utilizado com sucesso para tratar casos resistentes aos antimoniais. No entanto, já foi comprovada que a *Leishmania sp.* pode desenvolver resistência à miltefosina (JHA *et al.*, 1999; KEDZIERSKI *et al.*, 2009).

Além dos potentes efeitos adversos e da resistência apresentada à terapia medicamentosa, nas diferentes formas de *Leishmania*, ressalta-se, também, o alto preço dos medicamentos e a disponibilidade limitada a essa terapêutica em muitos países endêmicos, em que o acesso a alguns locais é restrito e existe limitação financeira da população e estado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). A miltefosina, opção mais recente para o tratamento da LTA, implantada ao Sistema Único de Saúde do Brasil pelo Ministério da Saúde, assessorado pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias – CONITEC, na Portaria nº 60 de 31 de outubro de 2018, publicada no Diário Oficial da União nº 210, de 31 de outubro de 2018, seção 1, página 40, provoca um aumento orçamentário de até vinte milhões de reais em cinco anos, o que excede a realidade financeira do sistema público de muitos países (BRASIL, 2018).

Dessa forma, a pesquisa por novas drogas antiparasitárias contra diferentes formas de leishmaniose, com menor toxicidade para o usuário, principalmente com custo razoável, continua sendo uma prioridade clínica e é fundamental (RATES, 2001; ANVERSA *et al.*, 2018). Terapias alternativas, não

farmacológicas ou então que tenham ação sinérgica ao tratamento padrão, podem ajudar a oferecer uma aderência maior desses pacientes a essa terapêutica (CABRAL *et al.*, 2020; BANHUK *et al.*, 2020)

1.3 Ozônioterapia

Tratamentos alternativos para a LTA são conhecidos há bastante tempo e a importância de novas modalidades de tratamento é fundamental, pois as feridas causadas pela LC são, muitas vezes, deformantes, as quais trazem complicações estéticas e funcionais ao portador (AYRES *et al.*, 2011; JABBAR; JUNAID, 1986).

O ozônio é conhecido por sua capacidade antimicrobiana, desinfetante e esterilizante. A ozônioterapia tem ganhado espaço na medicina, tem sido utilizado como adjuvante de alguns tratamentos devido ao seu efeito oxidativo em tecidos inflamados, ativando a resposta imune capaz de destruir bactérias, fungos e vírus. As propriedades químicas apresentadas pelo ozônio são usadas no tratamento de feridas infectadas, inflamações cutâneas e ulcerações, além de tratar infecções de alguns órgãos quando a antibioticoterapia não consegue controlar ou eliminar bactérias resistentes (BIALOSZEWSKI *et al.*, 2011).

Com relatos de aplicação de forma empírica e de maneira imprecisa há 200 anos (1826), o ozônio é uma molécula instável que consiste em três átomos de oxigênio que pode rapidamente quebrar em oxigênio e átomo de oxigênio único. Tem sido amplamente utilizada como um agente de tratamento de mais de 50 processos patológicos, bem como doenças de pele (ZENG; LU, 2018). O gás ozônio tem peso molecular de 47,98 g/mol. À temperatura ambiente, tem um odor forte e uma cor azul. É considerado o terceiro oxidante mais potente após flúor e persulfato. Pode agir como um precursor de muitos radicais. Artificialmente, é necessário um gerador capaz de promover descargas elétricas para formação de ozônio. Algumas de suas moléculas decompõem-se rapidamente e a outra parte permanece estável por horas, com uma meia-vida de cerca de 10 horas (em pH = 7 e 20°C). Pode permanecer na água por alguns dias, se armazenado em recipiente de vidro bem fechado. O ozônio

também pode ser misturado com óleos (pode gerar aldeídos, cetonas e peróxidos de hidrogênio) (NÉRI *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação da terapia com ozônio pode ser dividido em três aspectos: imunomodulação, atividade antimicrobiana e capacidade de interagir com o balanço oxidante/antioxidante (PIVOTTO *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2019). Em seu efeito antimicrobiano, o ozônio interrompe diretamente o ácido nucleico ou o lipossoma de microrganismos. Depois que a membrana está danificada, a permeabilidade aumenta e as moléculas de ozônio podem facilmente entrar nas células. Além disso, gera reações de nível molecular no meio onde libera radicais livres de oxigênio e, então, destrói indiretamente o microrganismo vivo (TRAVAGLI *et al.*, 2010; POLYDOROU *et al.*, 2012; THANOMSUB *et al.*, 2002).

O efeito do ozônio sobre o tecido aplicado é baseado na oxidação de materiais biológicos por ataque direto ao microrganismo, exibindo efeitos sobre o sistema imunológico, o que modula atividade fagocítica (TASDEMIR *et al.*, 2013).

Com relação ao mecanismo do ozônio no sangue, essa molécula reage com o plasma e com os ácidos graxos insaturados presentes nas membranas das células, produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e produtos de oxidação dos lipídios, que estimulam a liberação de interleucinas (IL), as quais auxiliam a quimiotaxia dos leucócitos para os tecidos. Além disso, também estimula a liberação do fator de crescimento e transformação 1 (TGF-1), que é importante na aceleração do reparo tecidual, ativando os linfócitos e monócitos e, também, a liberação de citocinas nos tecidos e na circulação, gerando, dessa forma, uma estimulação do sistema imunológico (MARCHESINI; RIBEIRO, 2020).

A ozônioterapia é uma técnica de baixo custo, previsível e conservadora, apresentando poucos efeitos adversos. Estudos relatam que o gás ozônio atua destrutivamente contra bactérias, fungos e vírus, ao mesmo tempo, ativando o sistema imunológico celular e humoral, bem como atuando como antioxidante para defender várias condições patológicas. Entretanto, diferentes efeitos sistêmicos de propriedades físico-químicas do ozônio são poucos elucidados, por exemplo, os efeitos do óxido nítrico na secreção biossintética, analgésica e vasodilatadora. Isso classifica esse gás como um promissor elemento na

pesquisa terapêutica (ZENG; LU, 2018; ALBERTO, 2011; ROSALES *et al.*, 2005).

As leishmanioses são doenças negligenciadas pela indústria farmacêutica, assim como diversas outras infecções que acometem países em desenvolvimento, o que acarreta tratamentos com medicamentos bastante antigos, muitas vezes, com baixa eficácia e vários efeitos adversos. Acrescentando o óleo ozonizado como adjuvante ao medicamento de referência, pode-se diminuir o tempo de tratamento, melhorando a aderência e prognóstico da terapia dessa patologia.

Nesse contexto, o presente trabalho analisa a eficiência do tratamento com o óleo ozonizado, como elemento complementar ao medicamento de referência, em feridas causadas pelo parasita *Leishmania amazonensis* no coxim plantar de camundongos e, com isso, é possível caracterizar os efeitos locais e sistêmicos dessa forma terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, caracterizar e descrever a eficiência do tratamento pelo óleo ozonizado sobre lesões observadas na infecção causada pelo parasita *Leishmania amazonensis* em modelo animal, analisando essa eficiência como medida complementar ao medicamento de referência ou utilizado isoladamente.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a quantidade de ozônio no óleo, verificando o tempo necessário para atingir a quantidade do gás com efeito terapêutico, verificando também o tempo gasto para dissipação do gás do óleo;
- Avaliar a resposta *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos de animais infectados com *L. amazonensis*, quando submetidos ou não ao tratamento com óleo ozonizado;
- Avaliar a espessura e tamanho das lesões para os diferentes grupos infectados, durante e após o período de tratamento, avaliando também a evolução da cicatrização por parâmetros histológicos;
- Avaliar as respostas dos animais frente aos diferentes tipos de tratamento quanto ao número de leucócitos sanguíneos;
- Analisar e comparar a viabilidade dos parasitas retirados das lesões dos diferentes grupos de tratamento;
- Analisar a produção das citocinas TNF- α e IL-10 por macrófagos peritoneais de animais infectados e tratados;

- Analisar a produção das citocinas IFN- γ , IL-4 por células totais dos linfonodos drenantes da pata lesionada;
- Detectar o perfil do sistema de oxidação-antioxidação do tecido das patas lesionadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi submetido e autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE (CEUA), sob o protocolo nº 01/21 - CEUA (ANEXO 7.4).

3.2 Obtenção do óleo ozonizado

Foi utilizado óleo de girassol comercial, ao qual foi adicionado 10% de água destilada, além de Tween 80 como agente emulsionante. O óleo foi, então, ozonizado a partir de um gerador de ozônio (Ozone & Life, mod. 1.5 RM) acoplado a um tanque de oxigênio por um período de 15 horas a uma taxa de 0,5L/min.

A dosagem de ozônio foi feita de forma indireta, calculando-se o valor de peróxidos totais no óleo, sendo o procedimento realizado segundo Martinez *et al.* (2006), utilizando 0,5 g de óleo, ao qual foram adicionados 30 mL de uma mistura 3:2 de Ácido acético glacial (CH₃COOH) e Clorofórmio (CHCl₃) e 0,5 mL de solução saturada de KI. Após homogeneização, a mistura foi deixada no escuro por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados 30 mL de água destilada e a mistura foi vagarosamente titulada com Na₂S₂O₃ 0,01 M até a cor amarela quase desaparecer. Finalmente, foram adicionados 5 mL de amido e a titulação continuou até a cor azul desaparecer. Os valores de peróxido (Pv) foram obtidos pela fórmula:

$$\frac{Pv: 10 \times V}{W}$$

Em que: V é o volume de Na₂S₂O₃ em mL e W é o peso do óleo em g (TELLEZ *et al.*, 2006).

3.3 Manutenção dos parasitas

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio 199 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) estéril e 5 µg/mL de hemina, por meio de repiques semanais, a fim de manter a viabilidade das células.

3.4 Animais

Trinta e seis (36) camundongos fêmeas BALB/c, oriundos do Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), com 60 dias de vida, receberam dieta padrão em ração comum e água *ad libitum*. Foram mantidos em caixas padrão, em grupos de 6 animais, com ciclo de claro e escuro de 12 horas.

3.5 Procedimento experimental

Os animais com 60 dias (8 semanas) de vida foram divididos em 5 grupos com 6 animais cada:

Grupo I (G1) - Animais infectados com *L. amazonensis*, tratados com Glucantime® e com óleo ozonizado local.

Grupo II (G2) - Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com óleo ozonizado local.

Grupo III (G3) - Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com Glucantime®.

Grupo IV (G4) - Animais infectados com *L. amazonensis* e não tratados (controle positivo da lesão).

Grupo V (G5) - Animais não infectados. Foi inoculada solução PBS estéril na mesma quantidade inoculada para a infecção (controle negativo).

3.6 Inoculação dos parasitas

Para o desenvolvimento do modelo experimental de lesão, os animais com 60 dias de vida receberam a inoculação de uma suspensão de *L. amazonensis* com aproximadamente 1×10^5 parasitas, de forma intradérmica, no dorso da pata posterior direita, por meio de seringa e agulha, sob anestesia com Ketamina 50mg/kg e Xilazina 5mg/kg.

3.7 Administração do tratamento

O tratamento com ozônio iniciou por volta de 6 a 8 semanas após a indução da infecção, com o aparecimento da lesão (os animais com 120 dias de vida). Para isso, cerca de 0,1 mL (duas gotas) de óleo ozonizado foi

aplicado sobre as lesões com auxílio de uma pipeta Pasteur, todos os dias, durante 30 dias. Os grupos submetidos ao tratamento com Glucantime® receberam a droga diariamente, intraperitoneal, na dose de 50 mg/Kg diluído em soro fisiológico 0,9%.

3.8 Mensuração da lesão

No primeiro dia e a cada dez dias, durante o tratamento (dia 0, 10, 20 e 30), foi mensurada a espessura da lesão em milímetros, com uso de um paquímetro. Também, foram realizados registros fotográficos para proceder a análise de morfometria da lesão, a fim de avaliar a cicatrização da ferida.

3.9 Contagem de leucócitos

Antes do início e a cada dez dias do tratamento, foi feita a contagem dos leucócitos sanguíneos dos animais de todos os grupos. Para isso, foi feito um pequeno corte com tesoura na extremidade da cauda e coletado 5 µL de sangue, o qual foi adicionado a 45 µL de líquido de Turk; as células foram, então, contadas em câmara de Neubauer, conforme técnica descrita por Cabral *et al.*, 2020 (CABRAL *et al.*, 2020).

3.10 Análise da pata lesionada

Ao final do tratamento (30 dias), os animais foram sacrificados utilizando excesso de anestésicos (Ketamina 270mg/kg e Xilazina 30mg/kg), sendo posteriormente procedida a retirada da pata lesionada, que foi dividida em quatro segmentos: o primeiro teve o conteúdo da lesão retirado e colocado em cultura para observação do desenvolvimento de formas viáveis de *L. amazonensis*, conforme item 3.11.

O segundo e o terceiro segmento da pata foram retirados, colocados em eppendorfs devidamente identificados e armazenados em nitrogênio para sua conservação. Com o segundo segmento, foram realizadas as técnicas de oxidação do tecido (em colaboração com o laboratório de Investigações

Biológicas (LinBio) – Unioeste) (item 3.13). Com o terceiro segmento, foram realizados ensaios de Western Blotting, conforme item 3.12.

O quarto segmento do tecido lesionado foi utilizado para realização da análise histológica. Tal qual, foram fixados com solução de Formaldeído 10% em água destilada durante 24 horas. Após isso, o material ficou em água corrente durante 48 horas para retirar todo o Formaldeído e, então, foi estocado no álcool 70% por 24 horas. O material foi retirado da solução de estoque e lavado com água corrente durante 30 minutos, para, assim, começar o procedimento de descalcificação.

Para o processo de descalcificação, o material foi mantido em solução descalcificante (5% de Ácido tricloroacético diluído em tampão PBS) durante 10 a 30 dias, com verificação diária da descalcificação da peça e troca semanal da solução descalcificante. Após a descalcificação, o material foi estocado novamente em álcool 70% até a realização do processo de inclusão do material em parafina (item 3.19).

3.11 Cultura de promastigotas de *L. amazonensis* da pata lesionada – Carga parasitária

Após a eutanásia dos animais, um fragmento da lesão foi retirado de forma asséptica com Iodopovidona (PVPI), com o auxílio de bisturi e pinça, de maneira que foi colocado em um microtubo contendo 550 µL de Meio 199 com seu volume previamente pesado. Após a adição do fragmento, o tubo foi novamente pesado a fim de se obter o peso do tecido. Posteriormente, o fragmento foi depositado em placa de 6 poços, contendo 1,5 mL de Meio 199 e macerado com auxílio do êmbolo de uma seringa de 10 mL. Após a maceração, o conteúdo foi passado em uma seringa de 1 mL cerca de 20 vezes, com cuidado e evitando pegar partes de tecido; após isso, o conteúdo foi depositado em tubo de 15 mL estéril onde foram adicionados mais 2 mL de Meio 199.

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados, ao primeiro poço, 200 µL de Meio 199 e 100 µL da suspensão; foi feita, então, uma diluição seriada

utilizando 150 µL de meio e 150 µL da suspensão precedente, obtendo-se os títulos de 1/3, 1/6, 1/12, 1/24, 1/48, 1/96, 1/192 e 1/384.

A placa foi embalada com papel filme e incubada em estufa B.O.D a 25°C. Ao primeiro dia e nos 4 dias seguintes, foi observada diariamente em microscópio invertido (Nikon, modelo Eclipse TS 100), avaliando-se a titulação conforme a presença de formas promastigotas viáveis de *L. amazonensis*. Todas as titulações que apresentaram parasitas foram contadas em câmara de Neubauer.

3.12 Análise das vias inflamatórias por Western blot

Com o segmento destinado à análise por WB, o tecido foi congelado em nitrogênio líquido até o momento da extração proteica. Utilizando-se um tampão de extração de proteínas teciduais (EDTA 10 mM, Trisma base 100 mM, pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio, PMSF 2 mM, aprotinina, água deionizada e triton 10%), o tecido foi processado em equipamento politron até completa homogeneização. Após esse período, o tecido processado permaneceu no gelo por 40 minutos e, então, foi centrifugado a 10.000 rpm por 40 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (extrato proteico) foi utilizado para a dosagem de proteína, que foi realizada pelo método de Bradford.

Para análise das vias de sinalização, os lisados da pata foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra e incubadas em banho seco por 5 minutos a 95 °C; 20 µg de proteína foi aplicada em cada poço do gel de poliacrilamida-SDS. A separação das proteínas foi feita em cuba de eletroforese (tampão de corrida: Triss 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,5%), a 125 V por aproximadamente 120 minutos. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%), a 90 mA durante 90 minutos. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi colocada em solução de leite desnatado (5%), em tampão Tris-salina (TBS)-Tween, durante 1 hora para minimizar as ligações inespecíficas, incubadas com anticorpo primário na diluição de 1:1000, durante 15 a 18 horas, sob agitação a 4 °C. Após esse período, a solução de anticorpo foi retirada, as

membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário durante 2 horas na diluição de 1:20000.

A cada etapa de incubação, a membrana foi lavada com TBST, durante 5 minutos, por 3 vezes consecutivas. Como anticorpos primários, foram utilizados anti-phospho ERK 42/44. O anticorpo anti-mouse GAPDH (*Cell Signaling Technology*, Danver, Massachusetts, Estados Unidos da América) foi utilizado para normalização dos valores adquiridos com os anticorpos primários; como anticorpo secundário, foi utilizado HRP-conjugado anti-mouse IgG (Abcam, Cambridge, Reino Unido). A revelação foi realizada baseado na técnica de quimiluminescência utilizando ECL (*Enhanced Chemiluminescence* – ECL; Amersham, Arlington Heights, Illinois, Estados Unidos da América) no equipamento Chemi L-Pix Express fotodocumentador (Locus Biotecnologia, São Paulo, São Paulo, Brasil); a densidade relativa da banda foi analisada pelo software Image Studio Lite Versão 5.2.

3.13 Biomarcadores de atividade antioxidante

O fragmento submetido à atividade das enzimas antioxidantes foi congelado em nitrogênio líquido até a extração das proteínas. O fragmento da pata foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A quantificação proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford, utilizando, como padrão, a albumina sérica bovina (BRADFORD, 1976). O sobrenadante foi separado e utilizado para as análises seguintes. Foi detectada atividade da glutathione peroxidase e da glutathione S-transferase, conforme demonstrado por da Silva Scarton *et al.* 2022 (DA SILVA SCARTON *et al.*, 2022).

3.14 Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos

Os macrófagos peritoneais dos animais, dos grupos acima descritos, foram obtidos, após encerrado o período de tratamento, por meio da exposição do peritônio de camundongos eutanasiados com Ketamina e Xilazina, com anterior assepsia seguida com infusão de 10 mL de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4°C, na cavidade peritoneal dos camundongos. Em seguida, foi realizada a massagem na região peritoneal para obtenção dos macrófagos. O PBS foi retirado com a própria agulha e seringa de inoculação e a suspensão

resultante foi transferida para um tubo estéril cônico e centrifugada a 1500 rotações por minuto (rpm) por 06 minutos, a 4°C.

Para a realização dos experimentos nos quais se determinou a produção de óxido nítrico (NO) e produção de TNF- α e IL-10, o “pellet” de células obtido após centrifugação foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI, contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina para contagem em Câmara de Neubauer e ajuste de volume na concentração de 1×10^6 células por poço, sendo, então, plaqueadas, em triplicata, em placas de 24 poços. Após a incubação por 2 horas, a 37°C, sob 5% de dióxido de carbono (CO_2), foi retirado e adicionado novo meio RPMI em todos os poços, sendo que, em metade deles, foi adicionado LPS (100 ng/mL). Após 48h, esse sobrenadante foi retirado e utilizado para dosagem de NO, conforme item 3.16, e dosagem de TNF- α e IL-10 por imunoenzimático (ELISA) da marca Peptotech™, seguindo instruções do fabricante.

3.15 Obtenção de linfonodos poplíteos de camundongos

Os linfonodos poplíteos drenantes da pata lesionada foram retirados dos animais assepticamente e o preparo do homogenato efetivou-se da mesma forma que o fragmento da lesão, na análise da carga parasitária (tópico 3.11). Foi realizada a contagem de células totais em câmara de Neubauer, padronizando o número em 2×10^6 células por poço em placas de 24 poços. As células foram plaqueadas juntamente com meio RPMI e antígeno solúvel de *L. amazonensis* (SLA) a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A placa foi incubada por 48 horas a 37°C a 5% de CO_2 , sendo o sobrenadante recolhido posteriormente para realização de dosagem de NO, conforme item abaixo, e das citocinas IL-4 e IFN- γ por imunoenzimático (ELISA) da marca Peptotech™, seguindo instruções do fabricante.

3.16 Estimativa da produção de NO por dosagem de Nitrito

Para esta análise, utilizamos o método descrito por Green *et al.* (1982) com modificações. As placas, contendo os macrófagos, como descrito no item 3.14, foram tratadas com LPS em metade dos poços, contendo as células dos

animais; os demais poços receberam somente meio RPMI. O tratamento foi incubado a 37°C sob 5% de CO₂ por 48 horas. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram utilizados para reagir com 100 µL do reagente de Griess (solução 1:1 de naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v)) e, após 10 minutos, para a estabilização da formação do produto (composto azo), foi, então, realizada a leitura em leitor de microplaca a 550 nm. Os dados foram expressos como micromolar (µM), por meio de curva-padrão obtida com concentrações molares conhecidas de NaNO₂ em meio RPMI.

3.17 Dosagem de citocinas IL-6

A produção da citocina interleucina 6 (IL-6) no plasma de camundongos foi detectada pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), usando kits da Peptotech, Inc® (New Jersey, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

3.18 Histologia

A técnica histológica utilizada nesse experimento seguiu o protocolo do laboratório de Histologia da UNIOESTE, orientado pelo professor Dr. João Paulo Arruda de Amorim, tal qual descrita a seguir:

Com a completa descalcificação do material, ele foi passado para o processo de inclusão do material em parafina (técnica de inclusão de material em parafina, descrita em ANEXOS 7.1).

O material foi processado em cortes histológicos seriados de 5 micrômetros. A lâmina com o material cortado, ainda em parafina, foi fixada em estufa a 80°C durante 24 horas. Após isso, foi desparafinada, hidratada e corada pelas técnicas de coloração Hematoxilina & Eosina e Tricrômico de Masson (técnicas de coloração descritas em ANEXOS 7.2 e 7.3, respectivamente).

As análises dos achados histológicos foram realizadas de forma qualitativa por meio de leitura em microscópio (Olympus, modelo CX31), nas objetivas de 100x e 400x, avaliando os infiltrados de leucócitos e a morfologia do tecido, analisado em HE, e a tonalidade de cor devido à produção de colágeno no

tecido na técnica de Tricrômico de Masson. O material foi avaliado também de forma quantitativa por meio do programa Image Pro-Plus 6.0 (descrito no item 3.19, a seguir).

3.19 Análises histológicas

Para as análises histológicas, foi utilizado o programa Image Pro-Plus 6.0 e foram avaliados o tamanho da epiderme em μm e a quantidade de leucócitos presentes na derme do tecido. Para essas análises, foram separados aleatoriamente o material de 2 animais por grupo, foram fotografados pelo menos 6 cortes histológicos de cada pata, com três fotos de cada corte histológico. Para a medição da epiderme, foram escolhidos sete locais aleatórios em cada fotografia. Para a contagem do infiltrado, foram escolhidos nove locais aleatoriamente para as contagens em cada uma das imagens, compreendendo, em todas as imagens, a mesma área final.

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. Quanto à normalidade, foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk e, sendo considerados paramétricos, foram submetidos à análise estatística pelo teste de ANOVA com pós-teste de Tukey.

3.20 Avaliação da atividade leishmanicida do óleo ozonizado na recuperação de formas promastigotas *in vitro*

Macrófagos de 6 camundongos BALB/c saudáveis, com 60 dias de vida (protocolo nº 01/21 – CEUA), foram obtidos conforme o item 3.14 e colocados na concentração de 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços e deixados aderir por 3h. A seguir, o meio foi retirado e formas promastigotas de *L. amazonenses*, na concentração de 1×10^6 parasitas, foram inseridas em cada poço (proporção de 5 parasitas por macrófago). Após 6h de incubação em ambiente de CO_2 (5%) e temperatura de 34°C , os poços foram lavados para retirar os parasitas não internalizados. Após a lavagem e retirada dos sobrenadantes, foram adicionadas diferentes concentrações de óleo ozonizado diluído em meio 199 (10; 20; 40; 80 e $160\mu\text{g/mL}$), meio 199 como controle

negativo, óleo não ozonizado, diluído em meio 199 na mesma quantidade que a maior concentração de óleo, contendo ozônio e Glucantime® 300 µg/mL, como controle positivo, conforme descrito por Cabral *et al.*, (2020).

Após 48h de incubação, os sobrenadantes com os tratamentos foram retirados e as formas promastigotas desses sobrenadantes foram contadas em câmara de Neubauer. Após a retirada dos sobrenadantes, os poços foram lavados, adicionado meio 199 sem tratamento, incubado em ambiente de CO₂ (5%) e temperatura de 34°C; o procedimento de contagem das formas promastigotas, lavagem dos poços e adição de novo meio 199 sem tratamento foram repetidos nos tempos de 120h e 312h.

3.21 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à estatística analítica para comparação das médias, por meio do teste de ANOVA; para tanto, foi adotado o nível de confiança de 95%, tendo significância valores de $p < 0,05$. Foi usado o programa GraphPad Prism, versão 8.0 e Microsoft Excel, ambos para plataforma Windows 10 da Microsoft.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dosagem do óleo ozonizado

O ozônio é uma molécula relativamente estável quando introduzida em veículos oleosos (VALACCHI *et al.*, 2005), sendo assim, a dosagem mensal da amostra de óleo de girassol (comercial) ozonizado foi realizada voluntariamente por um pesquisador do Laboratório de Imunologia Aplicada da UNIOESTE (LIAU), em apenas uma análise amostral, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Dosagem da concentração de ozônio no óleo de girassol comercial durante 30 dias, utilizando a titulação iodométrica. Foram analisados uma unidade experimental a cada 10 dias. O óleo não ozonizado atuou como controle negativo.

	PV (valor de peróxido)	mg O₃/g óleo
DIA 0	1200 mEq/Kg	76,53 mg/g
DIA 10	1140 mEq/Kg	72,71 mg/g
DIA 20	1466 mEq/Kg	93,50 mg/g
DIA 30	1048 mEq/Kg	66,84 mg/g
ÓLEO NÃO OZONIZADO	184 mEq/Kg	11,74 mg/g

Houve um nível maior na dosagem do DIA 20 para as demais análises, muito provavelmente em razão da utilização de apenas uma unidade experimental por teste, sendo necessária uma nova dosagem com maior número amostral por dia para confirmação. A concentração de ozônio (determinada indiretamente pelo valor de Peróxido) foi significativamente maior naquelas amostras obtidas de óleo ozonizado do que não ozonizado (NOz), chegando a ser mais de cinco vezes maior (Figura 3).

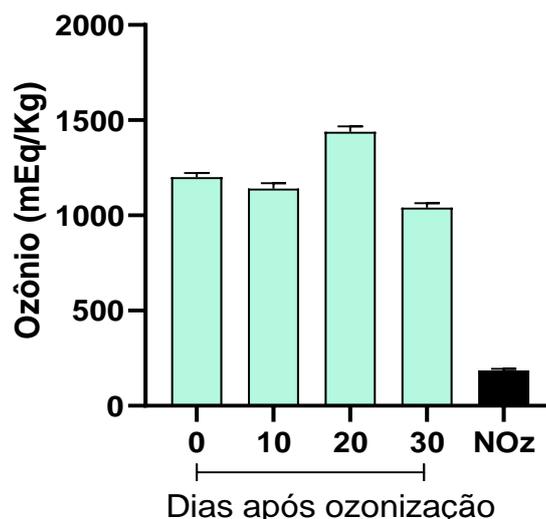


Figura 3: Dosagem da concentração de ozônio em mEq/Kg no óleo de girassol comercial durante 30 dias. Foram realizadas dosagens indiretas de O_3 por meio da detecção de Pv no dia da ozonização e a cada 10 dias. NOz: Oleo de girassol comercial não ozonizado (controle negativo) (N=1).

Anteriormente, em nosso laboratório, Cabral *et al.* (2020) utilizaram a ozonioterapia aquosa para tratamento de infecções cutâneas de leishmaniose em camundongos murinos; apesar do bom resultado da cicatrização, relataram que o gás se dissipa muito rápido quando diluído em água, mantendo sua concentração terapêutica por no máximo 24 horas. Entretanto, como demonstrado na tabela 1, os níveis do DIA 0 para o DIA 30 tiveram pouca variação das dosagens do óleo ozonizado, portanto, ele manteve-se estável durante os 30 dias de tratamento, qualificando o óleo de girassol como um bom veículo para ozônio.

Pivotto (2021) demonstrou que o ozônio foi capaz de se manter no óleo de girassol por três meses sob temperatura ambiente. De maneira similar, Bocci *et al.* (2004) relataram que, sob refrigeração, essa concentração pode permanecer estável por até dois anos (PIVOTTO, 2021; BOCCI *et al.*, 2004).

Sendo assim, devido ao nosso baixo N amostral, por ter sido realizado apenas para os 30 dias de tratamento, sugerimos a repetição das análises de concentração de ozônio em óleo de girassol comercial, utilizando mais replicatas e sendo avaliado por um período maior.

4.2 Análise *in vitro* da recuperação de formas promastigotas de *L. amazonensis* a partir de macrófagos peritoneais infectados

A partir de estudos anteriores, obtidos em nosso laboratório da ação do ozônio *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (CABRAL *et al.*, 2020) e da baixa toxicidade desse composto sobre macrófagos peritoneais de camundongos (PIVOTTO, 2021), buscou-se verificar a ação do óleo de girassol ozonizado sobre as formas amastigotas intracelulares do parasita. Assim, na tabela 2, é possível verificar o número de protozoários obtidos nos diferentes dias, nos quais foi observada a saída desses parasitas em cultura transformando-se em formas promastigotas. Percebe-se que, na concentração de 160 µg/mL, obteve-se o mesmo efeito do controle positivo (Glucantime®), isto é, não houve detecção de parasitas em nenhum dos dias analisados.

Tabela 2. Formas promastigotas ($\times 10^3/\text{mL}$) de *L. amazonensis* encontradas *in vitro* após 48, 120 e 312h, no sobrenadante de macrófagos infectados com o parasita e tratados com óleo ozonizado nas concentrações 10, 20, 40, 80 e 160µg/ml; Glucantime® na concentração de 300µg/ml; óleo não ozonizado e somente Meio 199 (como controle do óleo) (N=1).

	48h	120h	312h
Meio 199	100	200	10
Controle óleo	0	100	0
Glucantime	0	0	0
10µg/ml	200	200	20
20µg/ml	100	0	0
40µg/ml	300	0	30
80µg/ml	100	100	20
160µg/ml	0	0	0

O óleo ozonizado demonstrou ser um potente leishmanicida *in vitro*, sendo que, na concentração de 160 µg/ml, não foi encontrada nenhuma forma

promastigota no sobrenadante, sendo que, nessa análise, foi utilizado o medicamento de referência na concentração 300 µg/ml; o ozônio, com praticamente metade da dose do fármaco, conseguiu inibir o crescimento desses parasitas. Porém, o N amostral foi baixo para conseguir concluir esse sucesso e calcular a CI_{50} (Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo) do óleo ozonizado.

No tratamento com o controle negativo (somente Meio 199), houve um crescimento proporcional ao tempo analisado, tendo uma queda na última contagem provavelmente por conta do tempo de vida do parasita sem a suplementação ideal. O tratamento apenas com óleo de girassol comercial não apresentou nenhum protozoário na contagem após 48 horas; isso se deve provavelmente porque o meio tem uma tendência polar e a proporção de óleo/Meio 199 (160µl de óleo para 140µl de Meio 199), utilizado nesse tratamento, fez com que não chegasse à homogeneização correta. Dessa maneira, os primeiros parasitas que conseguiram se externar aos macrófagos não tiveram nutrientes adequados para sobreviver.

Cabral e colaboradores (2020), ao utilizarem o ozônio aquoso *in vitro*, classificaram o gás como um potente leishmanicida, relatando que concentrações a partir de 15 µg/ml do ozônio obtiveram o mesmo resultado do Glucantime®, resultando em uma CI_{50} de 0,5441 µg/ml, uma concentração extremamente baixa, o que comprova essa eficácia. Já Pivotto (2021), demonstrou que o óleo ozonizado na concentração de 5 µg/ml apresentou o mesmo efeito do Glucantime® na concentração de 300 µg/ml nas análises de tratamento *in vitro* anti-*Leishmania* (CABRAL *et al.*, 2020; PIVOTTO, 2021).

Mais estudos são necessários para avaliar essa eficácia do óleo ozonizado *in vitro*, avaliando uma maior quantidade amostral e replicatas, padronizando uma metodologia de análise, para que esse efeito leishmanicida seja apenas do ozônio ou da droga avaliada, e não do ambiente ou da homogeneidade do meio em que os tratamentos serão analisados.

4.3 Espessura das lesões

Segundo o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana do Ministério da Saúde, a cicatrização completa das lesões pode levar até 12 semanas com o medicamento de referência (Brasil, 2007); sendo assim, diminuir esse tempo de tratamento pode gerar uma melhor aderência dos pacientes e até diminuição dos seus efeitos adversos, sabendo que o nosso tratamento teve duração de apenas 30 dias.

Nas análises morfológicas das patas tratadas, verificamos que o grupo G1, tal qual, simula a ideia inicial do experimento; recebeu o tratamento do Glucantime® juntamente com o óleo ozonizado. Assim, a priori, foi o que demonstrou o resultado mais satisfatório entre o experimento, apresentando uma melhor cicatrização da pata lesionada. A evolução das lesões durante o tratamento pode ser observada na Figura 4.

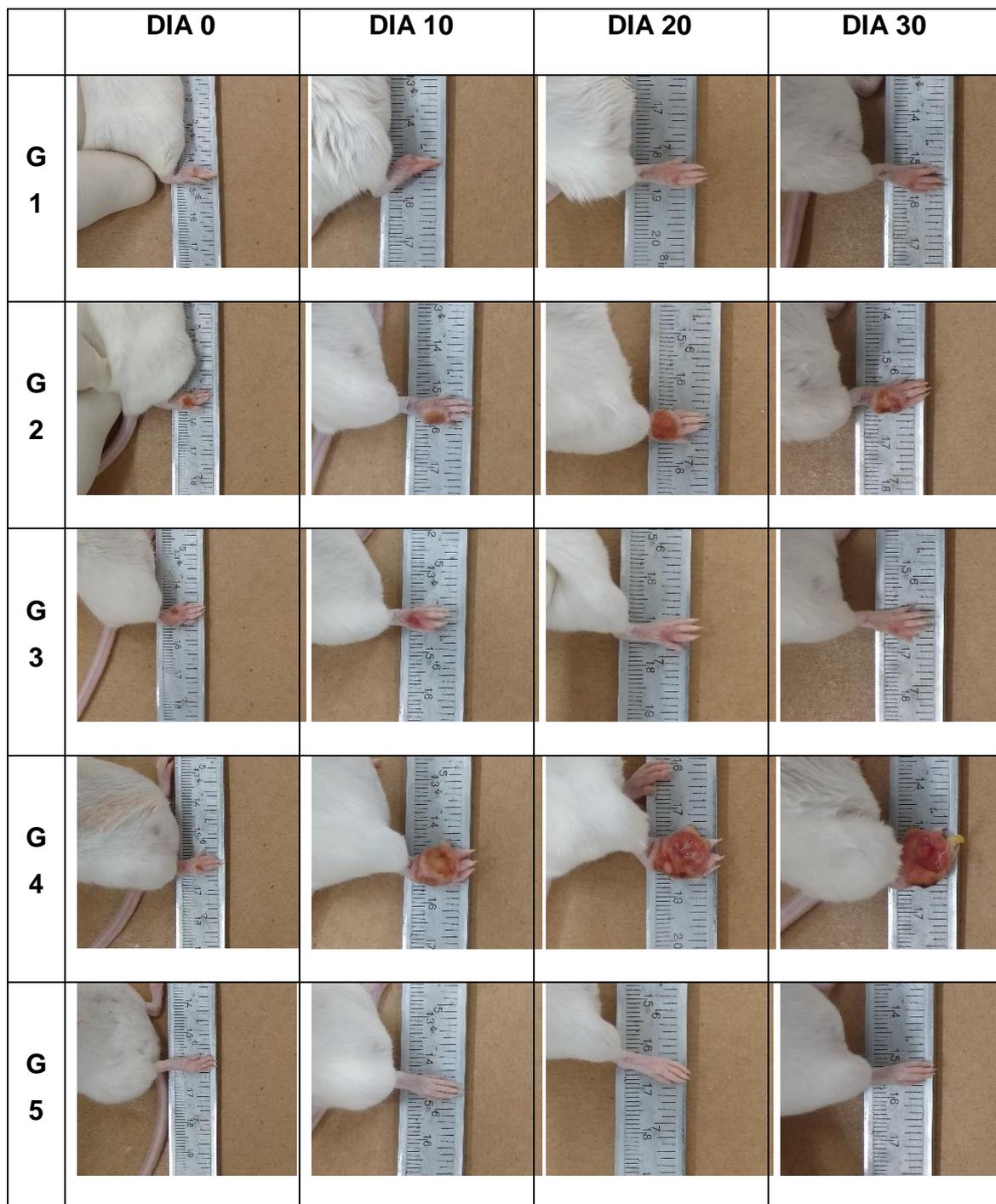


Figura 4: Análise morfológica das patas durante o tratamento. Foram selecionadas aleatoriamente as fotos de um camundongo por grupo, comparando e acompanhando a evolução do tratamento entre os dias 0, 10, 20 e 30. G1: tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, G2: tratado apenas com óleo ozonizado, G3: tratado apenas com Glucantime®, G4: infectado e não tratado (controle positivo) e G5: não infectado (controle negativo).

O grupo G2, no qual foi testado apenas o óleo ozonizado, poderia apresentar uma aceleração do processo de cicatrização, porém, isso não foi observado. Possivelmente, por consequência do seu uso tópico não conseguir alcançar tecidos mais internos, não eliminou os protozoários que parasitam a região mais profunda da lesão. Consequentemente, os parasitas não foram atingidos e conseguiram proliferar normalmente, de maneira que a ferida evoluiu.

O grupo G3, que recebeu o tratamento de primeira escolha para leishmaniose cutânea (Glucantime®), auxiliou como parâmetro comparativo ao grupo G1. Os efeitos dos Antimoniais são sabidos, por isso, nota-se que apresentou uma cicatrização semelhante ao G1, sendo esses dois grupos de animais os que apresentaram um melhor resultado nessa análise.

No grupo G4 (controle positivo da lesão), em que os animais foram infectados, mas não receberam nenhum tipo de tratamento, as feridas evoluíram gradativamente, apresentando, ao final do experimento, lesões desfigurantes, com uma inflamação exacerbada, o que demonstra o sucesso da infecção experimental.

O grupo G5 não recebeu infecção, sendo assim, auxiliou como controle negativo nos métodos de análises, simulando a histologia e metabolismo basal no experimento.

No grupo G1 (Glucantime® + óleo ozonizado), não foi observada uma diminuição expressiva do tamanho da pata na análise estatística, porém, conseguiu-se estabilizar o crescimento da lesão, impedindo o seu aumento. Já o grupo G3 (tratado apenas com Glucantime®), apresentou, na média, o melhor tamanho da pata ao final do tratamento, chegando mais próximo ao grupo controle negativo (G5), Figura 5.

Espessura das patas de animais infectados com *L. amazonensis*

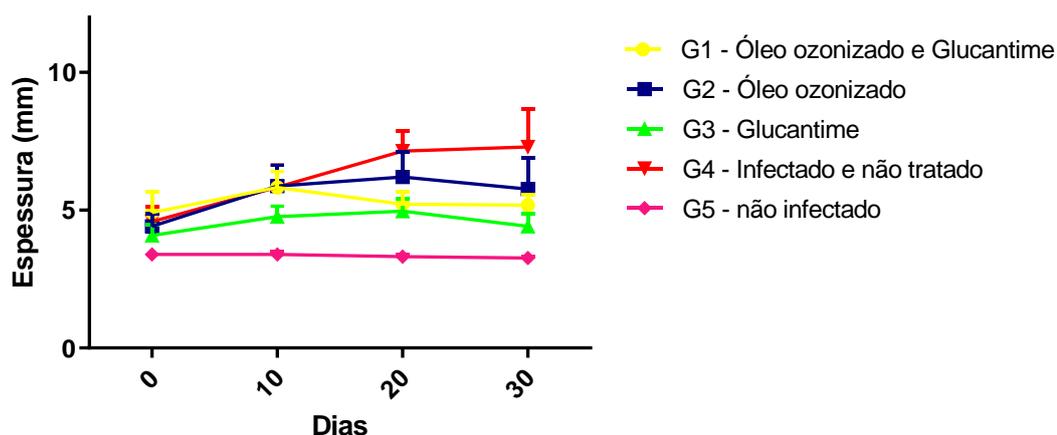


Figura 5. Espessura das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, em milímetros. Os resultados são as médias do tamanho das patas dos 6 camundongos de cada grupo, mensuradas nos dias 0, 10, 20 e 30 do tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de quatro a seis unidades experimentais por grupo.

A utilização do óleo de girassol ozonizado, como adjuvante ao Glucantime®, melhorou o aspecto das lesões dos animais infectados por *L. amazonensis*, determinando uma recuperação melhor do que quando o Glucantime® foi utilizado isoladamente, porém, o óleo ozonizado sozinho não proporcionou essa melhora. O ozônio pode acelerar a cicatrização de feridas (ANZOLIN *et al.*, 2020) e essa característica deve ser aproveitada adicionando óleo ozonizado ao arsenal de terapias contra LC, uma vez que é barato e acessível.

4.4 Cultura de promastigotas de *L. amazonensis* da pata lesionada

A cultura de formas promastigotas após o tratamento da lesão é eficaz para evidenciar a influência dessa terapêutica *in vivo* na diminuição de parasitas viáveis, já que, teoricamente, um número menor de células multiplica-se menos no decorrer do tempo (PIVOTTO, 2021).

A cultura da pata infectada (Tabela 3) demonstrou que os grupos G1 e G3 apresentaram uma baixa titulação, sendo observada a presença de formas

promastigotas apenas no quarto dia de análise. Isso se deve provavelmente ao efeito leishmanicida do Glucantime®, que já é sabido.

Tabela 3. Diluição da cultura de fragmentos das patas infectadas com *L. amazonensis* em meio 199. G1 - tratado com óleo ozonizado e Glucantime, G2 - tratado com óleo ozonizado, G3 - tratado com Glucantime, G4 – não tratado e G5 – não infectado. Os valores apresentados são a média de quatro a seis unidades experimentais por grupo. *NE (não foram encontradas formas promastigotas nessa titulação).

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
G1	NE	NE	NE	1/3
G2	1/192	1/192	1/192	1/384
G3	NE	NE	NE	1/3
G4	1/384	1/384	1/384	1/384
G5	NE	NE	NE	NE

O grupo G2 (recebeu apenas o óleo ozonizado) apresentou uma alta titulação de parasitas ao final do tratamento, o que demonstra que esse ozônio carregado pelo óleo não consegue atingir parasitas mais internos da lesão e a tendência é a evolução da doença. Sendo assim, a ozonioterapia pode atuar como um adjuvante no tratamento dessas lesões cutâneas causadas por parasitas, visto que tem um efeito leishmanicida em parasitas mais externos à lesão, porém, concomitantemente, precisa do medicamento de referência para eliminar os parasitas mais internos e resultar numa melhora dessas feridas.

4.5 Análises histológicas

Para analisar e caracterizar melhor esse efeito local do óleo ozonizado como adjuvante ao medicamento de referência na melhora da lesão e cicatrização da ferida, realizamos as análises histológicas qualitativas de um

fragmento da pata ao final do tratamento, para evidenciar a terapêutica que resultou na melhor reconstituição da epiderme lesionada e processo inflamatório local pela técnica de coloração Hematoxilina & Eosina; e qual grupo conseguiu uma maior produção de colágeno (proteína precursora do processo de cicatrização) nos tecidos analisados pela coloração de Tricrômico de Masson. Foi selecionado, aleatoriamente, o material histológico de dois camundongos por grupo, gerando seis lâminas com três cortes cada, sendo analisado de forma subjetiva e qualitativa em microscopia no aumento de 100x e 400x (Figura 6, 7 e 8).

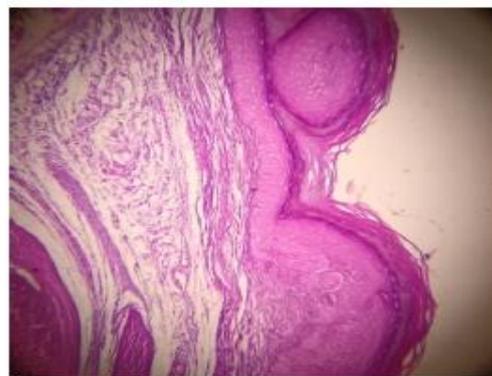
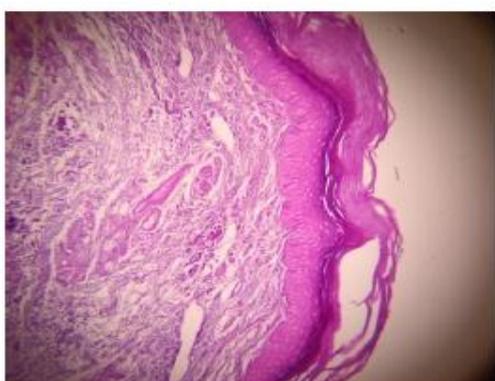
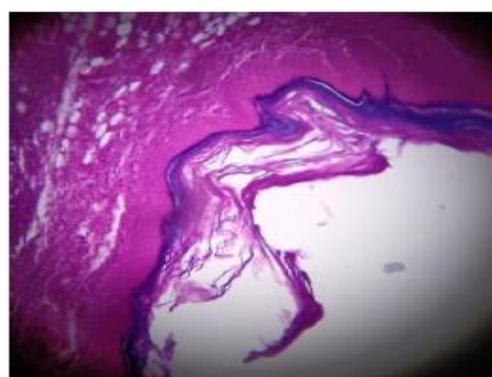
**G1****G2****G3****G4****G5**

Figura 6: Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E no aumento de 100x. GRUPO G1 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com óleo ozonizado e Glucantime®). GRUPO G2 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com óleo ozonizado). GRUPO G3 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com Glucantime®). GRUPO G4 (Animais infectados com *L. amazonensis* e não receberam nenhum tratamento) Controle positivo da lesão. GRUPO G5 (Animais não infectados) Controle Negativo.

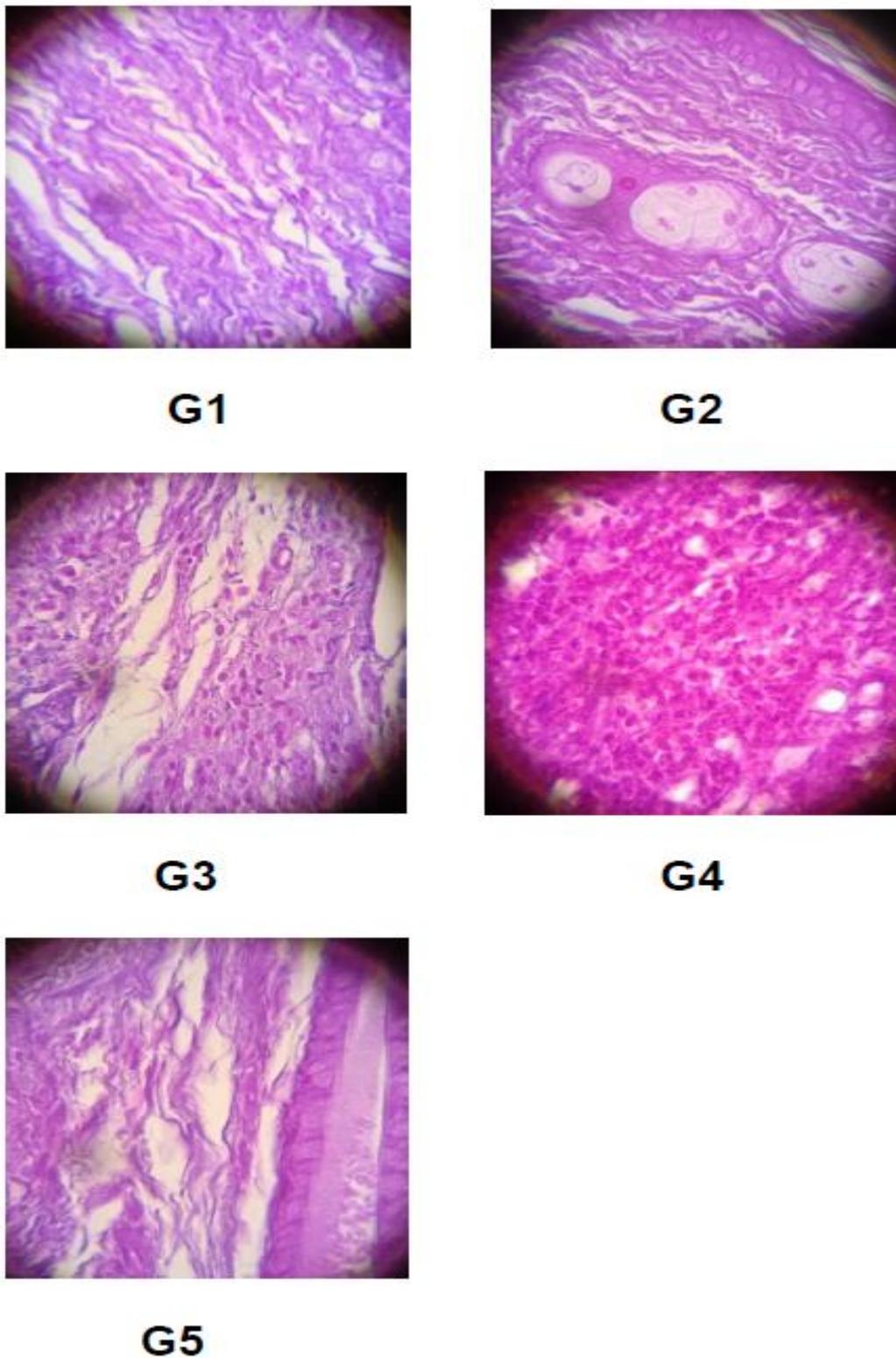
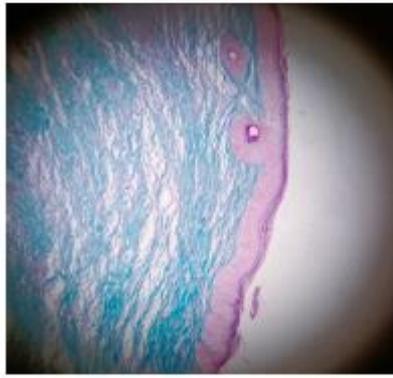
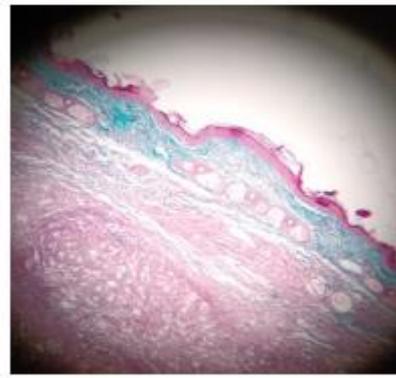


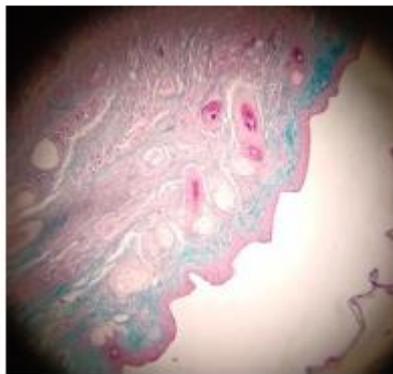
Figura 7: Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E no aumento de 400x. GRUPO G1 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com óleo ozonizado e Glucantime®). GRUPO G2 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com óleo ozonizado). GRUPO G3 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com Glucantime®). GRUPO G4 (Animais infectados com *L. amazonensis* e não receberam nenhum tratamento) Controle positivo da lesão. GRUPO G5 (Animais não infectados) Controle Negativo.



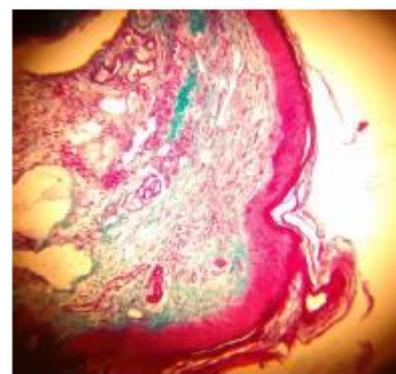
G1



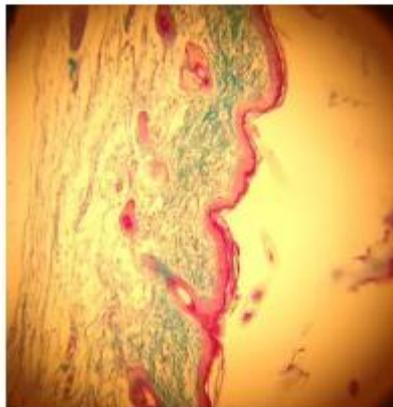
G2



G3



G4



G5

Figura 8: Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por tricrômico de Masson no aumento de 100x. GRUPO G1 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com óleo ozonizado e Glucantime®). GRUPO G2 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com óleo ozonizado). GRUPO G3 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com Glucantime®). GRUPO G4 (Animais infectados com *L. amazonensis* e não receberam nenhum tratamento) Controle positivo da lesão. GRUPO G5 (Animais não infectados) Controle Negativo.

Nos achados histológicos, notamos alterações histopatológicas que variaram de acordo com o tratamento. Os grupos tratados apenas com o óleo ozonizado (G2) e o controle positivo (G4 – infectado e não tratado) apresentaram uma descontinuidade do epitélio periférico devido às ulcerações (Figura 6), apresentando uma riqueza de parasitas e um grande infiltrado celular (Figura 7). Nos animais tratados apenas com Glucantime® (G3), observa-se uma grande quantidade de leucócitos no tecido analisado (Figura 7); juntamente com o grupo G1, expressaram uma melhor manutenção do epitélio em relação ao estado basal (Figura 6). Isso sugere que o efeito imunestimulante do Glucantime® é modulado com a terapia sinérgica com óleo ozonizado, sendo que o grupo G1 recebeu os dois tratamentos e apresentou uma melhor aparência do tecido analisado.

Lim *et al.* (2006) descobriram que a exposição de feridas ao ozônio estimulou o aumento da atividade do fator nuclear kappa B (NF-κB), um importante imunomodulador pró-inflamatório, que reforça a ideia de que o ozônio desempenha realmente papel anti-inflamatório e imunomodulador. Em Cardoso *et al.* (2000), foi possível observar que água ozonizada pode atenuar a aparência e a gravidade de úlceras gástricas, pois atua como modulador do processo de inflamação pela indução no processo de estresse oxidativo. Martinez Sanchez *et al.* (2005) avaliaram pacientes diabéticos adultos que tinham úlceras nos pés ou localizadas nas extremidades corporais e observaram que, em relação ao grupo tratado com antibióticos, o grupo que recebeu ozonioterapia evidenciou diminuição da área e perímetro da lesão, além de diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de cicatrização (LIM *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2000; MARTINEZ SANCHEZ *et al.*, 2005).

Quando avaliadas as peças coradas pelo corante Tricrômico de Masson (Figura 8), o qual avalia a presença de colágeno, foi possível identificar, ao final do tratamento, nos grupos G2 e G4, pouquíssima presença dele, concluindo-se, assim, que ambos apresentavam lesões ativas e nenhuma cicatrização em andamento. Já para os grupos G1 e G3, foram encontradas áreas de intenso depósito de colágeno, sendo mais presente no grupo G1, com cicatrização

evidente de áreas granulomatosas. Sendo assim, o ozônio, mesmo que usado de forma tópica e incorporado ao óleo de girassol, estimulou a produção do colágeno, um fator importantíssimo no processo de cicatrização. Além disso, é possível visualizar um maior alinhamento do tecido, caracterizando uma reorganização das fibras e mostrando um adiantado estado de cicatrização (Figura 8).

Em 2009, Kim *et al.* realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito terapêutico da ozonização de óleo na cicatrização de feridas em porcos. O grupo tratado com ozônio obteve uma redução significativa de feridas em relação ao grupo controle. Os tecidos foram corados, mostrando o aumento da intensidade das fibras de colágeno e fibroblastos no ozônio grupo (KIM *et al.*, 2009).

No grupo G1, nota-se que o ozônio complementa a ação do Glucantime®. Enquanto o medicamento inibe o crescimento do parasita e estimula o sistema imune, o ozônio age imunomodulando a inflamação e estimulando o processo de cicatrização. Isso é percebido ao comparar as três figuras (6, 7 e 8), as quais demonstram que os animais do grupo G1 apresentam lesões em resolução, com granulomas e baixa presença de parasitas.

A espessura da epiderme é um fator crucial na avaliação da recuperação de lesões e, aqui (Figura 9a), o grupo G3 (tratado somente com Glucantime®) foi quem demonstrou uma maior espessura entre as epidermes avaliadas, sendo significativamente maior que o grupo G2 (tratado somente com óleo de girassol ozonizado), o que é bastante surpreendente, visto a capacidade de cicatrização já demonstrada pelo ozônio (MARTINEZ SANCHEZ *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2009). Essa pequena espessura da epiderme do grupo somente tratado com óleo pode ser explicada em parte pela não resolução da infecção (Tabela 3), causando um ambiente inflamatório e dificultando a cicatrização necessária. Resultado semelhante foi relatado por Pivotto, 2021, mostrando que o óleo ozonizado isolado não acelera a cicatrização de lesões da leishmaniose cutânea (PIVOTTO, 2021).

A quantidade de células infiltradas nas lesões foi analisada quantitativamente nas lâminas confeccionadas e foi possível determinar (Figura 9b) que o grupo G4 detinha uma maior quantidade de leucócitos na área analisada; no entanto, essa quantidade foi significativamente maior somente que o grupo G1. Esse resultado é similar ao obtido por Pivotto, 2021, no qual o grupo tratado somente com Glucantime obteve um alto infiltrado celular, semelhante ao grupo não-tratado e que essa quantidade de células foi diminuída pela presença do óleo ozonizado, como relatado, aqui, em G1. Ressalta-se, ademais, que um alto número de células, como o apresentado por G4, não necessariamente resulta em melhor controle do parasita, pois *L. amazonensis* causa anergia de linfócitos, interferindo em suas funções (SANDOVAL PACHECO *et al.*, 2021).

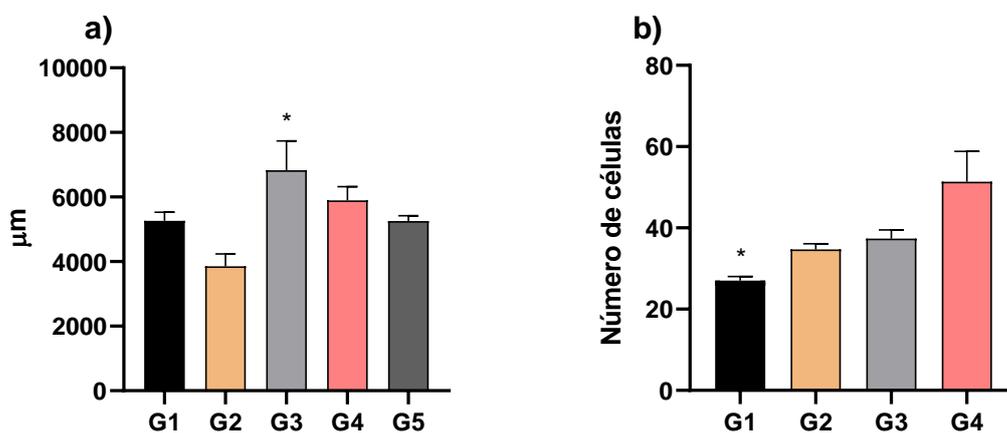


Figura 9. a) Espessura da epiderme das lesões de patas infectadas com *L. amazonensis* de animais infectados e tratados (G1, G2 e G3), infectados e não-infectados (G4) e não-infectados (G5). *Significativamente diferente do grupo G2: * $p < 0,05$. **b)** Infiltrado celular na derme de lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos infectados e tratados (G1, G2 e G3), infectados e não-infectados (G4). Significativamente diferente do grupo G4: * $p < 0,05$. GRUPO G1 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com óleo ozonizado e Glucantime®). GRUPO G2 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com óleo ozonizado). GRUPO G3 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com Glucantime®). GRUPO G4 (Animais infectados com *L. amazonensis* e não receberam nenhum tratamento) Controle positivo da lesão. GRUPO G5 (Animais não infectados) Controle Negativo.

4.6 Atividade antioxidante tecidual

Re *et al.*, em (2008), provaram que o ozônio é capaz de promover o aumento e preservação de sistemas antioxidantes endógenos, fomentando, assim, uma pré-condição oxidativa. Gracer *et al.*, em (2005), descreveram que a aplicação de ozônio no tecido inflamado pode favorecer a síntese da matriz extracelular, bem como proliferação celular e normalização metabólica (RE *et al.*, 2008; GRACER *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante de GPx (Glutaciona peroxidase) e GST (Glutaciona tranferase) é mostrada na Figura 10. Ambos os resultados (a e b) demonstraram que o grupo que recebeu os dois tratamentos (G1) obteve maior atividade antioxidante nos tecidos, com diferenças significativas para G3; o outro grupo, que resolveu a lesão, e G4 foi o grupo não tratado. Na análise GPx, ambos os grupos que receberam tratamento tópico ozonizado não mostraram diferença, mas uma diferença significativa foi observada em GST.

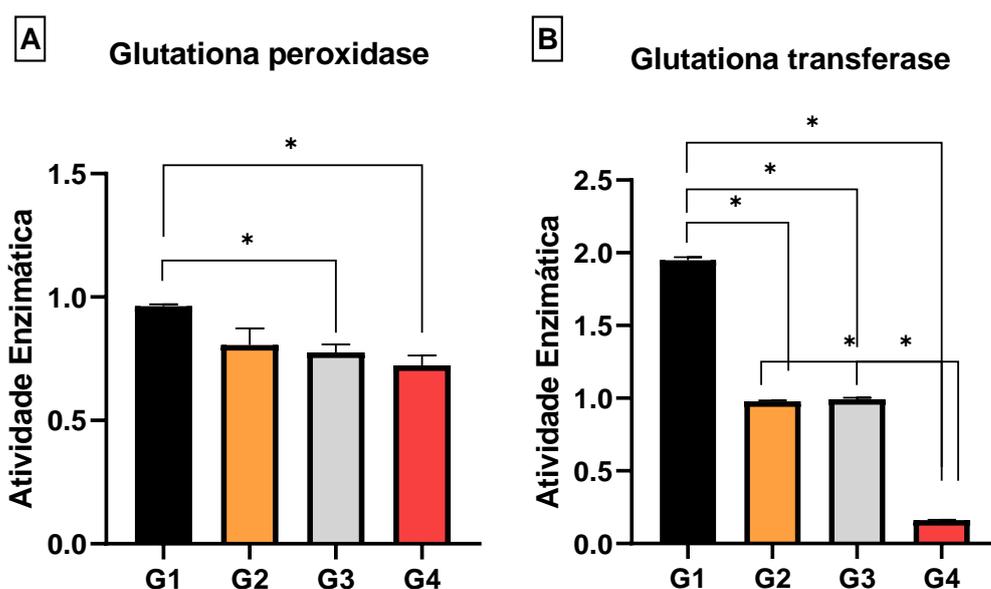


Figura 10: Biomarcadores de estresse oxidativo em patas infectadas por *L. amazonensis* de camundongos BALB/c tratados ou não. GRUPO G1 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com óleo ozonizado e Glucantime®). GRUPO G2 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com óleo ozonizado). GRUPO G3 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com Glucantime®). GRUPO G4 (Animais infectados com *L. amazonensis* e não receberam nenhum tratamento) Controle positivo da lesão. GPx, Glutaciona peroxidase; GST, Glutaciona S-transferase. Os dados são apresentados como a média de três dosagens em triplicata (\pm EPM). * $p < 0,05$.

A LC causa uma produção local substancial de reativos intermediários de oxigênio (ROS), que ocasionam inflamação pela secreção de mediadores pró-inflamatórios; também, os ROS produzidos durante uma resposta inflamatória levam à lesão oxidativa em células não infectadas. Durante o dano oxidativo, alguns radicais livres, que desempenham um papel essencial no dano ao colágeno, são liberados (SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2005). Além disso, a produção robusta de radicais livres de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$) esgota as enzimas antioxidantes protetoras, resultando em lesão celular na infecção por *L. amazonensis* (DIAS-TEIXEIRA *et al.*, 2016).

O óleo ozonizado aumenta a maquinaria antioxidante celular, resultando em menor dano causado por ROS e melhorando a cicatrização de feridas. A ativação dos elementos de resposta antioxidante (ARE), principalmente a via Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2), é responsável por essa ação (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2005). A ativação do NF- κ B também participa, levando a uma produção de TGF- β , o que colabora para a cicatrização (VALACCHI *et al.*, 2011). Em nosso estudo, a ativação da GPx e GST, em níveis mais elevados, juntamente com uma melhor cicatrização da pata, demonstraram a capacidade do óleo de girassol ozonizado nesse sentido.

4.7 Avaliação dos efeitos sistêmicos e locais dos tratamentos sobre o sistema imunológico

A resposta inflamatória atua na liberação de substâncias sinalizadoras, como citocinas e proteínas de coagulação, que acabam por desencadear a cascata de inflamação em associação com prostaglandinas, interleucinas (IL) e NO (NÉRI *et al.*, 2017). Com o objetivo de avaliar os efeitos no sistema imunológico que o uso desse óleo ozonizado tópico produz, realizamos as seguintes análises: contagem de leucócitos sanguíneos; Análise do diferencial das células sanguíneas; Estimativa da produção de NO por dosagem de Nitrito; Dosagem de citocinas; e análise das vias inflamatórias das patas infectadas por Western Blotting. Os resultados estão descritos a seguir:

Com relação à contagem de leucócitos sanguíneos dos animais, o grupo tratado com Glucantime® + óleo ozonizado (G1) obteve, ao final do tratamento,

um número significativamente maior que todos os demais grupos (Fig. 11b), mostrando, neste experimento, que o ozônio não foi capaz de diminuir significativamente o aumento de leucócitos proporcionado pelo Glucantime®. No início do tratamento, todos os grupos infectados mostravam valores semelhantes de leucócitos no sangue (Fig. 11a).

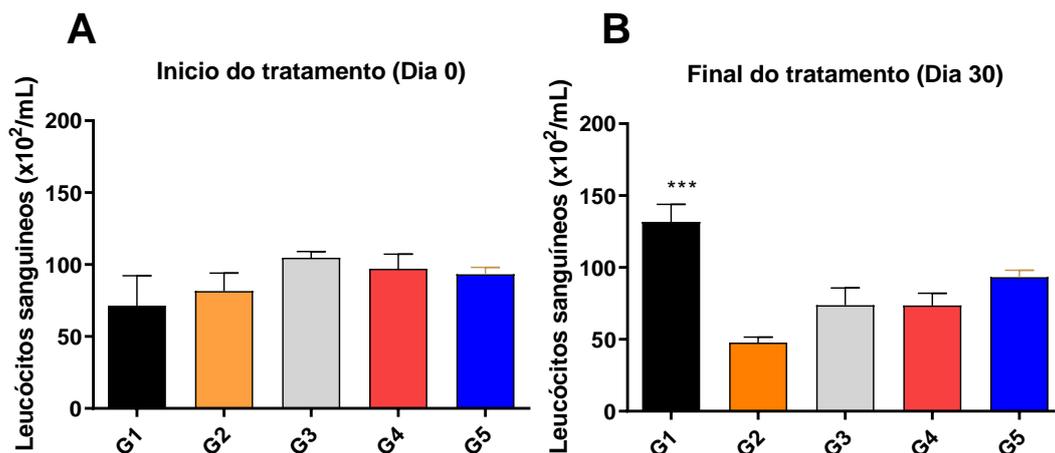


Figura 11. Número de leucócitos sanguíneos de camundongos infectados com *L. amazonensis* no início (a) e após trinta dias de tratamento (b). G1: tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, G2: tratado apenas com óleo ozonizado, G3: tratado apenas com Glucantime®, G4: infectado e não tratado (controle positivo) e G5: não infectado (controle negativo). * Diferença significativa para os demais grupos em 30 dias ($p < 0,05$).

A contagem diferencial feita com os leucócitos totais demonstrou que o G1 não atingiu diferença significativa na porcentagem de linfócitos e neutrófilos entre o início e o final do tratamento. Porém, observando os linfócitos, os demais grupos apresentaram maior número no primeiro dia e diminuíram esse percentual ao longo do período, com diferença significativa. Os neutrófilos fizeram o inverso, aumentando seu número ao longo do tempo (Figura 12).

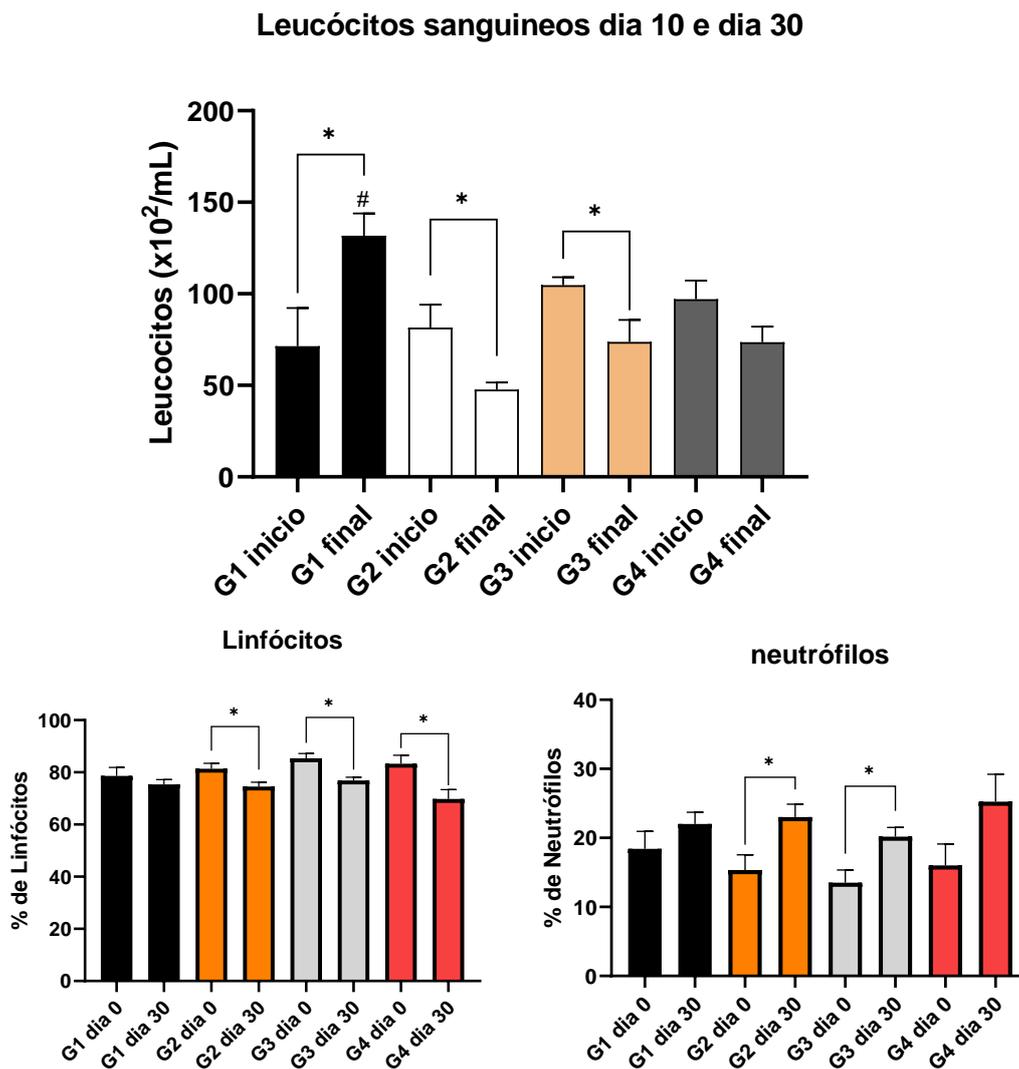


Figura 12: Número de leucócitos sanguíneos e avaliação do tipo de célula sanguínea de camundongos infectados com *L. amazonensis* no dia 10 e após 30 dias de tratamento. G1: tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, G2: tratado apenas com óleo ozonizado, G3: tratado apenas com Glucantime®, G4: infetado e não tratado (controle positivo) e G5: não infectado (controle negativo).

Embora o comportamento dos leucócitos sanguíneos seja semelhante nos grupos G2, G3 e G4, a secreção de citocinas e NO pelos macrófagos peritoneais demonstrou um aspecto inflamatório pronunciado, com o TNF- α atingindo níveis mais elevados no grupo não tratado (G4) do que nos demais. Já a IL-10, uma citocina anti-inflamatória, não apresentou diferenças (Figuras 15a e b). Confirmando isso, a secreção de NO pelos macrófagos peritoneais dos animais que não receberam tratamento atinge um nível superior aos

demais, sem diferença significativa para o G3 (grupo tratado apenas com Glucantime®).

A terapia de ozônio tem sido fortemente relacionada com o aumento da expressão de óxido nítrico. Se há deficiência, isso pode influenciar negativamente a reparação tecidual e seu papel relacionado à síntese de colágeno, por meio da regulação de fibroblastos (NÉRI *et al.*, 2017).

A Figura 13 mostra a dosagem de nitrito como estimativa da concentração de NO produzidos por macrófagos peritoneais e células totais de linfonodos, ambos obtidos dos animais utilizados no experimento. Na Figura 13^a, é possível observar que os macrófagos dos animais pertencentes aos grupos G4 (infectado e não-tratado) e G5 (não-infectado e não-tratado) produziram as maiores quantidades de NO quando não estimulados por LPS, o que foi surpreendente, principalmente por se tratar do G5, o grupo não infectado e não tratado. Já no G4, essa quantidade reflete a não resolução da infecção, com a permanência do parasita nos animais. Já quando estimulados com LPS, os macrófagos dos grupos G1 e G4 aumentaram a produção de NO, enquanto o G5 diminuiu a quantidade produzida.

Com relação ao NO produzido pelas células dos linfonodos drenantes das lesões, é possível observar, na Figura 13b, que não há uma produção significativa por nenhum grupo enquanto não foram estimulados, o que era esperado, visto que há um predomínio de linfócitos nessas células, os quais não são grandes produtores de óxido nítrico. No entanto, após receberem o antígeno de leishmania solúvel (SLA), as células do grupo G2 produziram-no de maneira muito intensa, tornando-se significativamente maior a concentração de NO produzida.

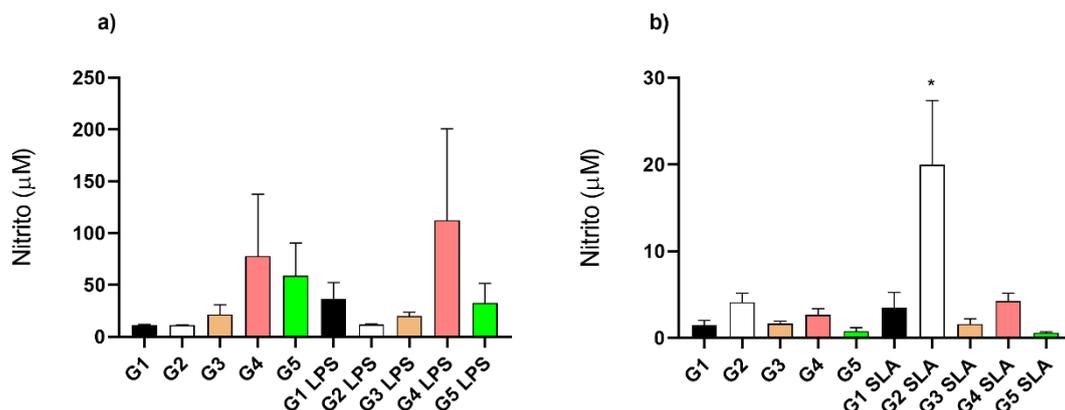


Figura 13: Análise da produção de óxido nítrico por dosagem de Nitrito por macrófagos peritoneais e dos linfonodos poplíteos, respectivamente. A) NO produzido por macrófagos peritoneais com e sem estímulo por Lipopolissacarídeos (LPS). B) NO produzido por macrófagos dos linfonodos (poplíteo) drenantes da lesão, com e sem estímulo por antígeno de *Leishmania* solúvel (SLA). * Diferença significativa para os demais grupos ($p < 0,05$).

A eliminação de patógenos de *Leishmania* pelo hospedeiro é realizada por meio de uma forte resposta pró-inflamatória acompanhada pela liberação de citocinas protetoras do hospedeiro, como IFN- γ e TNF- α (GHOSH *et al.*, 2020). A IL-4, por sua vez, é uma citocina que estimula a ativação de macrófagos pela via alternativa, resultando na sobrevivência do parasita e persistência da infecção (DAYAKAR *et al.*, 2019; PIVOTTO, 2021). Vários estudos demonstraram que a atividade leishmanicida dos macrófagos pode ser induzida por uma variedade de citocinas, sozinhas ou em combinação (GAAFAR *et al.*, 1995; KURTZHALS *et al.*, 1994). Segundo Dayakar *et al.*, (2019), em pacientes com LC, a resposta é dominada principalmente por IFN- γ e IL-4 raramente é detectada (DAYAKAR *et al.*, 2019).

A Figura 14 mostra os resultados obtidos a partir da dosagem das citocinas IFN- γ e IL-4 do sobrenadante das células totais retiradas dos linfonodos drenantes das lesões dos animais infectados e tratados, após 30 dias. É possível observar que o G3, tratado somente com Glucantime®, mostrou os maiores índices de IFN- γ , o que é condizente com o relatado na literatura, de que essa droga exerce um efeito inflamatório durante o tratamento, uma vez que o IFN- γ é uma citocina de perfil Th1. Quando os animais recebem Glucantime®, porém, são tratados simultaneamente com ozônio, de maneira que os níveis de IFN- γ caem, o que comprova o efeito imunomodulador dessa substância. Esse fato é comprovado observando-se os

níveis de IFN- γ do G2 (somente ozônio), inferiores aos demais grupos e com diferença significativa para o G1 e G3.

As dosagens de IL-4 mostram um resultado controverso, com o G3 novamente com as maiores quantidades dessa citocina, porém, com diferença significativa apenas para o G2, o que pode evidenciar uma inibição das células causada pelo óleo ozonizado e não uma tendência anti-inflamatória.

Quando observados os resultados da citocina TNF- α dosada a partir dos sobrenadante de macrófagos peritoneais dos animais, percebe-se que, estranhamente, os níveis de TNF- α estão mais altos nos animais não infectados e não tratados, os quais seriam os controles basais. No entanto, quando essas células são estimuladas com LPS, os macrófagos dos animais do grupo G1 tornam-se os maiores produtores, o que também é diferente do esperado, pois são os animais tratados com Glucantime® e ozônio. Tal resultado pode ser explicado pelo tempo de incubação ao qual esses macrófagos foram submetidos (48h), pois essa citocina é de liberação bastante rápida pelos macrófagos, alcançando picos nas primeiras 12h de incubação. Fenômeno semelhante foi observado para a citocina IL-10, com o grupo G5 (não-infectado e não-tratado), alcançando os maiores índices nos macrófagos não-estimulados e estimulados com LPS (Figura 15).

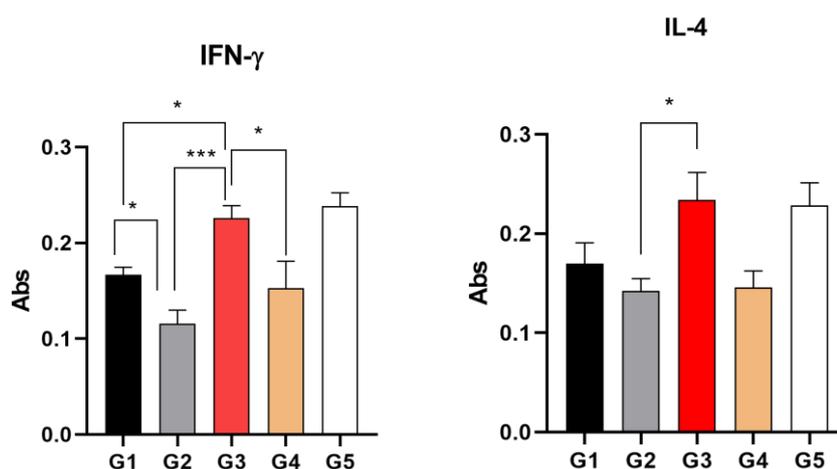


Figura 14: Dosagem das citocinas IFN- γ (esquerda) e IL-4 (direita) do sobrenadante de células totais obtidas de linfonodos drenantes das patas infectadas com *L. amazonensis* em animais BALB/c após 30 dias de tratamento. G1 - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, G2 - tratado com óleo ozonizado, G3 - tratado com Glucantime®, G4 - não tratado e G5 - não infectado.

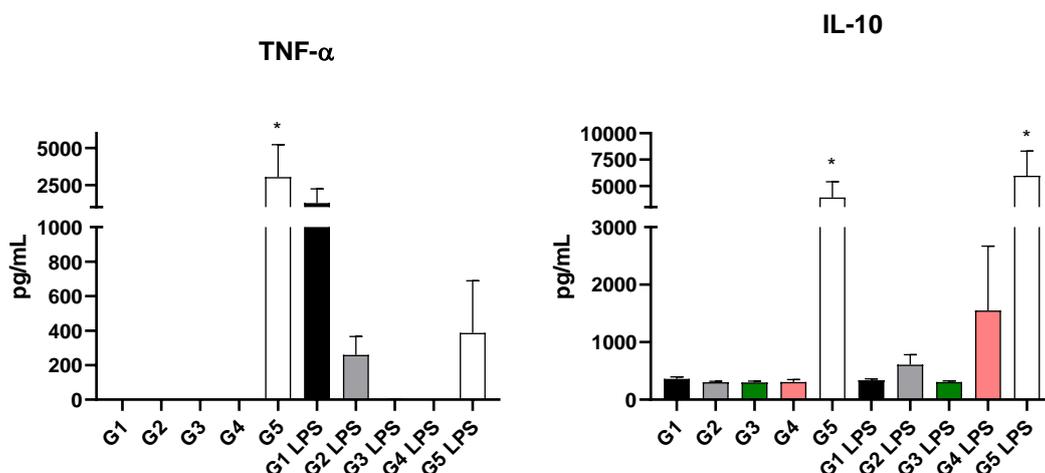


Figura 15: Dosagem das citocinas TNF- α (esquerda) e IL-10 (direita) do sobrenadante de macrófagos peritoneais obtidos dos animais infectados com *L. amazonensis* em animais BALC/c após 30 dias de tratamento. G1 - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, G2 - tratado com óleo ozonizado, G3 - tratado com Glucantime®, G4 - não tratado e G5 - não infectado.

Segundo Mahmood *et al.*, (2018), os altos níveis de IFN- γ são importantes para manter um equilíbrio entre as respostas de Th1 e Th2. Esse mesmo autor encontrou ainda uma alta quantidade de IFN- γ sérico em pacientes com LC quando comparados ao grupo controle. Embora a resposta imune inata do hospedeiro contra a leishmaniose seja importante, a imunidade mediada por células T e citocinas, produzidas a partir de várias células imunes, desempenham um papel crucial na determinação do desfecho da doença (DAYAKAR *et al.*, 2019). Todavia, outros estudos são necessários para avaliar a produção dessas citocinas na LC quando submetidas ao tratamento com óleo ozonizado (MAHMOOD, 2018; DAYAKAR *et al.*, 2019; PIVOTTO, 2021).

Com o conteúdo proteico das patas infectadas ou não, foi possível avaliar o efeito dos diferentes cenários sobre a expressão da proteína intracelular proteína quinase 1 e 2, a p-ERK 1 e 2 (também chamada de p-ERK 42/44), que faz parte do conjunto de proteínas da via das MAPK, e estão envolvidas nas vias de sinalização mediadas por vários receptores. A fosforilação em ERK 42/44 promove ativação de fator nuclear de transcrição do Kappa B (NF- κ B) e proteína ativadora de fator de transcrição 1 (AP-1), que irão regular a expressão de genes

indutores da inflamação. A maior ou menor expressão das ERK 42/44 fosforilada leva a contextos diferentes quanto à secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 (CATANZARO *et al.*, 2018). Nas Figuras 16b e 16c, é possível verificar que a expressão de p-ERK 44 foi maior nos grupos tratados, porém, sem diferença significativa para o grupo não tratado. Já a proteína pERK 42, aparece com destaque no grupo G1, também sem diferença para os demais. No entanto, tal fato é corroborado na dosagem da citocina IFN-gama (a seguir), a partir de células dos linfonodos drenantes das patas, nas quais esses mesmos grupos alcançaram diferença significativa para os demais.

É sabido que os ROS induzem uma forte ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como ERK1/2 e JNK (c-Jun N-terminal quinases), levando à translocação nuclear de NF- κ B (KEFALOYIANNI *et al.*, 2006). No entanto, uma maior expressão dos dois marcadores não foi observada no grupo não-tratado, não sendo possível detectar diferenças na expressão de ERK1/2 fosforilada entre os grupos.

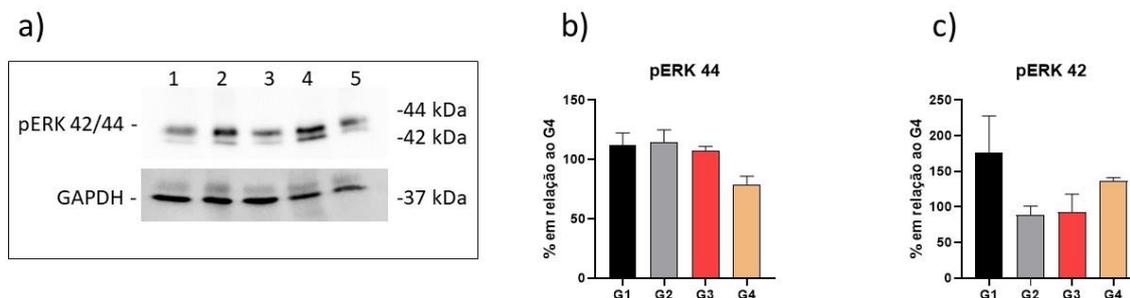


Figura 16: Análise da via de sinalização das MAPK em homogenato de patas infectadas com *L. amazonensis* após 30 dias de tratamento. a) Membrana representativa do Western blot sondada com anticorpos fosfo-ERK 42/44 e anti-GAPDH. 1 – G5; 2 – G4; 3 - G3; 4 - G2 e 5 – G1. b) e c) Relação fosfo-ERK 44/GAPDH (esquerda) e fosfo-ERK 42/GAPDH (direita) convertida em valores de porcentagem com relação ao G4 (grupo não-tratado). Os valores representam a média \pm EPM. N=3. GRUPO G1 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com óleo ozonizado e Glucantime®). GRUPO G2 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com óleo ozonizado). GRUPO G3 (Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados apenas com Glucantime®). GRUPO G4 (Animais infectados com *L. amazonensis* e não receberam nenhum tratamento) Controle positivo da lesão.

5. CONCLUSÃO

O óleo de girassol manteve-se estável durante os 30 dias de tratamento, qualificando-se como um bom veículo para ozônio. O óleo ozonizado demonstrou ser um potente leishmanicida *in vitro*, sendo que, na concentração de 160 µg/ml, não foi encontrada nenhuma forma promastigota no sobrenadante. A sua utilização como adjuvante ao Glucantime® melhorou o aspecto das lesões dos animais infectados por *L. amazonensis*, determinando uma recuperação melhor do que quando o medicamento de referência foi utilizado isoladamente.

O ozônio complementa a ação do Glucantime®. Enquanto o medicamento inibe o crescimento do parasita e estimula o sistema imune, o ozônio age imunomodulando a inflamação e estimulando o processo de cicatrização, aumentando a maquinaria antioxidante celular, o que resulta em menor dano causado por ROS. Quando os animais recebem Glucantime®, porém, são tratados simultaneamente com ozônio, os níveis de IFN-γ caem, o que comprova o efeito imunomodulador dessa substância. Nas análises morfológicas e histopatológicas, o grupo G1 (óleo de girassol ozonizado + Glucantime®) conseguiu estabilizar o crescimento da lesão, impedindo o seu aumento, de forma que apresenta um melhor aspecto e cicatrização do tecido.

Conclui-se que a terapia adjunta de óleo de girassol ozonizado e o medicamento Glucantime® foi eficaz no tratamento de lesões cutâneas da leishmaniose em modelo animal, causando uma erradicação do parasita *L. amazonensis* e promovendo uma recuperação das lesões nas patas em um período de tratamento de 30 dias. Dessa forma, a utilização do óleo ozonizado de girassol, como adjuvante, pode proporcionar menor tempo de tratamento aos pacientes, que serão, conseqüentemente, menos expostos aos efeitos colaterais do tratamento padrão de longo prazo.

6. REFERÊNCIAS

ALBERTO, Pepa Osvaldo. Ozone the one and only drug. In: **Advances in Minimally Invasive Surgery and Therapy for Spine and Nerves**. Springer, Vienna, 2011. p. 143-146.

AL-QAHTANI, Mubarak S. *et al.* Diagnostic dilemma of primary mucosal leishmaniasis. **Saudi medical journal**, v. 33, n. 11, p. 1234-1238, 2012.

AMEEN, Mahreen. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 11, n. 4, p. 557-569, 2010.

ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; PEREIRA, V. B. R.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**; 64(3):281-289, 2018.

AYRES, Diana Copi *et al.* Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 6, p. 329-334, 2011.

BANHUK, Fernanda Weyand. Avaliação das atividades tripanocida leishmanocida e imunomoduladora de extratos de sementes de *Lonchocarpus cultratus*. 2020. 77 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – PR.

BELKAÏD, M. *et al.* A propos d'un milieu simple pour l'isolement et la culture des leishmanies. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 89, n. 4, p. 276-277, 1996.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BIALOSZEWSKI, Dariusz *et al.* Activity of ozonated water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 17, n. 11, p. BR339, 2011.

BOCCI, Velio. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation*, v. 13, n. 1, p. 3–11, 2004. DOI: 10.1080/0962935062000197083. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2004/594205/abs/>.

BOCCI, Velio; ZANARDIA, Lacopo; VALACCHI, Giuseppe; BORRELLI, Emma; TRAVAGLI, Valter. Validity of Oxygen-Ozone Therapy as Integrated Medication Form in Chronic Inflammatory Diseases. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, v. 15, n. 2, p. 127–138, 2015. DOI: 10.2174/1871529x1502151209114642.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**, v. 2, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. ISBN 978-85-334-2474-6.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**, Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias – CONITEC – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar.pdf>.

Cabral IL, Utzig SL, Banhuk FW, Staffen IV, Loth EA, de Amorim JPA, Negretti F, Gandra RF, Ayala TS, Menolli RA. Aqueous ozone therapy improves the standard treatment of leishmaniasis lesions in animals leading to local and systemic alterations. **Parasitol Reserch**. 2020 Dec;119(12):4243-4253. doi: 10.1007/s00436-020-06925-8. Epub 2020 Oct 13. PMID: 33048207.

CASAGRANDE, Baltazar; GUIMARÃES, Raul Borges. Vetores das leishmanioses no Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD), Município de Teodoro Sampaio-SP, Brasil. **Geografia (Londrina)**, v. 28, n. 1, p. 225-238, 2019.

DA SILVA SCARTON, S.R., Tsuzuki, F., Guerra, M.T., dos Santos, D.P., dos Santos, A.C., Guimarães, A.T.B., Simão, A.N.C., Beu, C.C.L., Fernandes, G.S.A., 2022. Cyantraniliprole impairs reproductive parameters by inducing oxidative stress in adult female wistar rats. **Reprod. Toxicol**. 107, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.12.009>.

DAYAKAR, Alti; CHANDRASEKARAN, Sambamurthy; KUCHIPUDI, Suresh V.; KALANGI, Suresh K. Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00670.

FERREIRA, Antonio Walter; MORAES, Sandra do Lago. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes: correlações clínico-laboratoriais**. 2013.

FONSECA, Giuliana Schmidt França. Avaliação do desempenho de diferentes métodos no diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral humana. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.

GAAFAR, A.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KEMP, M.; HEY, A.; CHRISTENSEN, C .B. V.; DAFALLA, M.; EL KADARO, A. Y.; EL HASSAN, A. M.; THEANDER, T.G. Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 100, n. 2, p. 239–245, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb03660.x.

GHOSH, Sanhita; ROY, Kamalika; RAJALINGAM, Radhakrishnan; MARTIN, Sunil; PAL, Chiranjib. Cytokines in the generation and function of regulatory T cell subsets in Leishmaniasis. **Cytokine**, n. July, p. 155266, 2020. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155266. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155266>.

GOMES, Aparecida HS *et al.* PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 234-241, 2007.

GOMES, Aparecida HS *et al.* *Leishmania* (V.) *braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 3, p. 319-324, 2008.

GONÇALVES, Luiz Fernando Camargo Teixeira. Validação do diagnóstico molecular da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar na rotina diagnóstica de um laboratório de saúde pública, São Paulo, Brasil. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUEDES, Antonio Carlos Martins; CARVALHO, Maria de Lourdes R. de; MELO, Maria Norma. American tegumentary leishmaniasis: an unusual presentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 5, p. 445-449, 2008.

GUERRA, Priscila Valera *et al.* Avaliação do potencial imunomodulatório de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 na Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania braziliensis*. 2018. Tese de Doutorado. Instituto Gonçalo Moniz.

JABBAR, Abdue; JUNAID, N. Treatment of cutaneous leishmaniasis with infrared heat. **International journal of dermatology**, v. 25, n. 7, p. 470-472, 1986.

JHA, T. K. *et al.* Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

KEDZIERSKI, Lukasz et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 5, p. 599-614, 2009.

KURTZHALS, J. A. L.; HEY, A. S.; JARDIM, A.; KEMP, M.; SCHAEFER, K. U.; ODERA, E. O.; CHRISTENSEN, C. B. V.; GITHURE, J. I.; OLAFSON, R. W.; THENADER, T. G.; KHARAZMI, A. Dichotomy of the human T cell response to Leishmania antigens. II. Absent of Th2-like response to gp63 and Th1-like response to lipophosphoglycan- associated protein in cells from cured visceral leishmaniasis patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 96, n. 3, p. 416–421, 1994. DOI: 10.1111/j.1365-2249.1994.tb06044.x.

LAINSON, Ralph; RANGEL, Elizabeth F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAURENTI, Márcia Dalastra. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.

LESSA, Marcus Miranda *et al.* Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

MAHMOOD, Estabraq; TAHER, Huda M.; MOHAMMED, Shibab A. Determination of IFN - γ and TNF - α levels in serum of patients with cutaneous leishmaniasis. **Tikrit Journal of Pure Science**, v. 23, n. 9, p. 1813–1662, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.25130/tjps.25.2020.109>.

MARTINEZ TELLEZ, Goitybell; LEDEA LOZANO, Oscar; DÍAZ GÓMEZ, Maritza. Measurement of peroxidic species in ozonized sunflower oil. *Ozone: Science and Engineering*, v. 28, n. 3, p. 181–185, 2006. DOI: 10.1080/01919510600689356.

MARZOCHI, M. C. D. A.; SCHUBACH, O. D.; MARZOCHI, B. F. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CIMERMAN, B. C. S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 2001. v. 1, p. 39-64.

MURRAY, Henry W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NÉRI, Júlia dos Santos Vianna *et al.* Ozone therapy influence in the tissue repair process: A literature review. **Journal of Oral Diagnosis**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2017.

POLYDOROU, Olga *et al.* The antibacterial effect of gas ozone after 2 months of *in vitro* evaluation. **Clinical oral investigations**, v. 16, n. 2, p. 545-550, 2012.

Pivotto, AP, Banhuk, FW, Staffen, IV, Daga, MA, Ayala, TS e Menolli, RA (2020). Clinical uses and molecular aspects of ozone therapy: A review. **Online Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 37–49, 2020.

PIVOTTO, Ana Paula. O óleo de girassol ozonizado atua como coadjuvante ao Glucantime no tratamento da leishmaniose cutânea em modelo animal. 2021. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR.

RAMOS-E-SILVA, Marcia; DE MOURA, Castro Jacques C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. **Clinics in dermatology**, v. 20, n. 2, p. 122, 2002.

RATH, Susanne *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, 2003.

REED, Steven G. Diagnosis of leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 471-478, 1996.

REITHINGER, Richard *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REY, Luis. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**, 3ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2001; p.214. ID: lil-407068.

ROSALES, Frank A. Hernández *et al.* Ozone therapy effects on biomarkers and lung function in asthma. **Archives of medical research**, v. 36, n. 5, p. 549-554, 2005.

SALMAN, Salah M.; RUBEIZ, Nelly G.; KIBBI, Abdul-Ghani. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. **Clinics in dermatology**, v. 17, n. 3, p. 291-296, 1999.

SOUZA, João Henrique de. Avaliação da ação tripanocida e leishmanicida de extratos de *Eugenia pyriformis*. 2019. 5 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2019.

STAFFEN, Izabela Virginia. Avaliação das atividades leishmanicida, tripanocida e imunomoduladora de extratos de raízes de *Lonchocarpus cultratus*. 2020. 92 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR.

SUNDAR, Shyam; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, 3(3-4): 98-109, 2016.

TASDEMIR, C. *et al.* Evaluation of the effects of ozone therapy on *Escherichia coli*-induced cytitis in rat. **Irish journal of medical science**, v. 182, n. 4, p. 557-563, 2013.

THANOMSUB, Benjamas *et al.* Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 48, n. 4, p. 193-199, 2002.

TRAVAGLI, V. *et al.* Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. **Mediators of inflammation**, v. 2010, 2010.

TRAVI, Bruno L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 2018.

VALACCHI, Giuseppe *et al.* Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 1, p. 107-115, 2011.

ZENG, Jinrong; LU, Jianyun. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International immunopharmacology**, v. 56, p. 235-241, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis – WHO, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 25 mai. 2022, 01:38:30.*

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis – WHO, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 20 nov. 2022.*

7. Anexos

7.1 Montagem (inclusão) de material em parafina (Paraplast®)

➤ **Fixação:**

Colocar as peças (material) em formol 10% tamponado (tampão fosfato).

Fixar por 24 horas e lavar em água corrente por 48 horas.

Estocar em álcool 70% até o início da inclusão.

➤ **Desidratação:**

Material estocado em álcool 70%.

30 minutos em álcool 80% ➡ 2 vezes.

30 minutos em álcool 95% ➡ 2 vezes.

30 minutos em álcool 100% ➡ 2 vezes.

➤ **Diafanização:**

Xilol + álcool 100% (1:1) ➡ 30 minutos.

Xilol 100% (1 e 2) ➡ 20 minutos.

Xilol PA ➡ 20 minutos.

➤ **Infiltração:**

Paraplast® + Xilol ➡ 2 horas a partir do momento em que o Paraplast® derreter.

*Obs: cuidar o momento em que o Paraplast® derreter.

Paraplast® puro II ➡ overnight stay (pernoite) +/- 14 horas.

Paraplast® puro III ➡ 3 horas.

➤ **Inclusão:**

Montar as caixinhas de papel no tamanho do material a ser incluso.

Pegar Paraplast® puro, encher a caixinha e orientar a peça.

Deixar endurecer a temperatura ambiente.

7.2 Coloração Hematoxilina & Eosina.

Desparafinar, hidratar.

Hematoxilina 10 minutos  lavar 5 minutos em água destilada.

Álcool Absoluto por 30 segundos.

Eosina 5 minutos  lavar para retirar o excesso.

Desidratar, diafanizar e montar.

7.3 Coloração Tricômico de Masson

Solução A:

- 0,5g de fucsina ácida;
- 0,5g de ponceau de xilidina;
- 1 ml de ácido acético glacial;
- 100ml de água destilada;

Solução B:

- 1g de ácido fosfomolibdico;
- 100ml de água destilada;

Solução C:

- 2g de verde luz ou fast green;
- 2ml de ácido acético glacial;
- 100ml de água destilada;

Procedimento:

- Desparafinizar e hidratar;
- Lavar em água de torneira por 3 a 10 minutos;
- Lavar em água destilada por 3 minutos – 2 vezes;
- Corar em Hematoxilina por 30 segundos;

- Lavar em água de torneira por 3 a 10 minutos;
- Lavar em água destilada por 3 minutos – 2 vezes;
- Corar em solução A por 10 minutos;
- Lavar em água destilada por 3 minutos – 3 vezes;
- Corar em solução B por 5 minutos;
- Lavar em água destilada por 3 minutos – 3 vezes;
- Corar em solução C por 7 minutos;
- Lavar em água destilada por 3 minutos – 3 vezes;
- Passar em ácido acético glacial 1% por 3 minutos;
- Desitrar e montar;

Resultados:

Citoplasma – Vermelho

Músculo – Vermelho

Colágeno – Verde ou Azul

Eritrócitos – Vermelho

Núcleo – Marrom escuro

7.4 Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa



Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa

Nº 01/21 - CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da eficiência do óleo ozonizado no tratamento de infecções cutâneas causadas pela leishmaniose", registrada com o número "10-20", sob a responsabilidade de "Rafael Andrade Menolli", que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (UNIOESTE), em reunião de 09/04/2021

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/03/2020 a 08/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico - Balb/c
Nº de animais	60
Peso/Idade	25 gramas - 60 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dra. Sara Cristina Saggae Schneider
Vice Coordenadora do CEUA