



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

**O ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO ATUA COMO COADJUVANTE AO
GLUCANTIME NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM
MODELO ANIMAL**

ANA PAULA PIVOTTO

CASCABEL - PR

2021

ANA PAULA PIVOTTO

**O ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO ATUA COMO COADJUVANTE AO
GLUCANTIME NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM
MODELO ANIMAL**

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(a) 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

Coorientadora: Prof^a. Dra. Thais Soprani Ayala

CASCADEL - PR

2021

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

Pivotto, Ana Paula

O óleo de girassol ozonizado atua como coadjuvante ao Glucantime no tratamento da Leishmaniose Cutânea em modelo animal / Ana Paula Pivotto; orientador Rafael Andrade Menolli; coorientadora Thais Soprani Ayala. -- Cascavel, 2021.

91 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, 2021.

1. Imunologia. 2. Parasitologia. 3. Doenças Tropicais Negligenciadas. I. Menolli, Rafael Andrade, orient. II. Ayala, Thais Soprani, coorient. III. Título.

ANA PAULA PIVOTTO

**O ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO ATUA COMO COADJUVANTE AO
GLUCANTIME NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM
MODELO ANIMAL**

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(a) em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

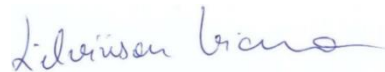
Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli

Coorientadora: Prof^a. Dra. Thais Soprani Ayala

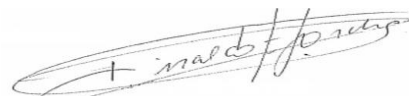
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Universidade Federal da Integração
Latino-Americana
UNILA



Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE

BIOGRAFIA RESUMIDA

Ana Paula Pivotto, natural de Corbélia, Paraná, Brasil, nascida em 29 de março de 1994, graduou-se em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel, tendo finalizado o curso em 16 de dezembro de 2016 e colado grau em 7 de fevereiro de 2017. Ingressou no Programa de Pós-Graduação *lato sensu* – Residência Farmacêutica em Análises Clínicas em março de 2017, finalizando-a em fevereiro de 2019. Em março de 2019 iniciou as atividades como aluna do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas. Trabalha como Farmacêutica Bioquímica no Hospital Universitário do Oeste do Paraná, desde abril de 2019 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, orientada pelo Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli e coorientada pela Prof^a Dra. Thais Soprani Ayala.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós e não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós.”

(O Pequeno Príncipe - Antoine de Saint-Exupéry)

Ao meu noivo Rodrigo Trage, que esteve ao meu lado nos bons e maus momentos e que não mediu esforços para me apoiar nessa etapa tão importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me guiar e iluminar sempre nas minhas escolhas de vida.

À minha família, principalmente à minha mãe Hilda e meu irmão Sidnei por todo apoio, tanto moral quanto financeiro, desde o ensino primário, até esse momento tão importante na minha vida acadêmica e profissional. E por todo carinho recebido desde a perda do meu pai José Pedro, que se estivesse aqui hoje eu sei que estaria muito orgulhoso da minha trajetória.

Ao meu noivo Rodrigo, por todo amor recebido nesses últimos anos, por toda parceria e cumplicidade, obrigada pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Dr. Rafael e à minha coorientadora Dra Thais, obrigada por compartilharem todo o conhecimento de vocês comigo, foi uma honra fazer parte do Laboratório de Imunologia Aplicada e ter vocês como exemplo, agradeço de coração por toda paciência e por todo suporte durante esses últimos anos, vocês são incríveis.

E por fim, à minha segunda casa, a Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho.

O ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO ATUA COMO COADJUVANTE AO GLUCANTIME NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM MODELO ANIMAL

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas consideradas um grande problema de saúde pública, com elevada incidência e ampla distribuição geográfica. Os medicamentos disponíveis para o tratamento dessas doenças, além de escassos, possuem muitos efeitos adversos, são tóxicos e casos de resistência do parasita já foram relatados. O óleo ozonizado tem sido utilizado topicamente para o tratamento de feridas crônicas, possuindo, entre outras vantagens, reduções importantes no tempo de recuperação dos pacientes, maior efetividade e maior adesão, bem como, menor custo total do tratamento. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência do óleo ozonizado de girassol no tratamento de lesões causadas pela leishmaniose em modelo animal. Para isso foram utilizados 5 grupos de camundongos Balb/c infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com óleo ozonizado local, óleo não ozonizado e o medicamento de referência (Glucantime®). As concentrações utilizadas de óleo ozonizado variaram de 0,625 a 320 µg/mL e foram avaliadas, dentre outros experimentos, a viabilidade celular de macrófagos murinos tratados e não tratados, além da atividade sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis in vitro*. O grupo que apresentou os melhores resultados foi o tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, no qual o ozônio contribuiu para a diminuição da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos e não apresentou citotoxicidade contra os mesmos, com um CC₅₀ de 84,21 µg/mL e um CI₅₀ de 1,71 µg/mL. Houve ainda uma diminuição da carga parasitária em cultura e em esfregaço superficial, além da manutenção razoável do epitélio celular na análise histológica. Ademais, essa terapia conjunta contribuiu para a diminuição na espessura da pata infectada e melhorou a cicatrização. Constatou-se também a alta produção de TNF-α e IFN-γ e menor produção, quando comparados com o grupo não tratado, de IL-4 pelas células dos camundongos. Enfim, a terapia adjunta de óleo ozonizado de girassol e o medicamento Glucantime® é eficaz na eliminação dos parasitas de *Leishmania amazonensis*, tanto *in vitro* como *in vivo*, promovendo a cura das lesões cutâneas causadas pela leishmaniose. Dessa forma, a utilização do óleo como adjuvante, propicia um menor tempo de tratamento aos pacientes, que serão conseqüentemente, menos expostos aos efeitos colaterais do tratamento padrão de longo prazo.

PALAVRAS-CHAVE: ozonioterapia, atividade anti-*Leishmania*, lesões cutâneas.

OZONIZED SUNFLOWER OIL AS A COADJUVANT TO GLUCANTIME IN THE TREATMENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN ANIMAL MODEL

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of neglected tropical diseases considered a public health problem, with high incidence and wide geographic distribution. The drugs used for the treatment of these diseases have many adverse effects, are toxic and cases of parasite resistance have already been reported. Ozonized oil has been used topically for the treatment of chronic wounds, having important reductions in patients' recuperation time, greater effectiveness and accession, as well as lower cost of treatment. Therefore, the aim of this study was to evaluate the efficiency of ozonized sunflower oil in the treatment of skin wounds caused by leishmaniasis in animals. Thereby, 5 groups of Balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and treated with ozonized oil, non-ozonized oil and the standard drug (Glucantime®) were used. The concentrations of ozonized oil used was from 0.625 to 320 µg/mL and the cell viability of treated and untreated murine macrophages was evaluated, among other experiments, as well as the activity on promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis in vitro*. The group that showed the best results was the one treated with ozonized oil and Glucantime®, whereupon ozone contributed to the decrease in the production of nitric oxide by murine macrophages and did not show cytotoxicity against them, with a CC₅₀ of 84.21 µg/ml and an IC₅₀ of 1.71 µg/ml. There was also a decrease in the parasite load in cultures and in lesions surface, in addition to the maintenance of the cellular epithelium in the histological analysis. Furthermore, this joint therapy contributed to a decrease in the thickness of the infected paw and improved healing. It was also verified the high production of TNF-α and IFN-γ and lower production, when compared to the untreated group, of IL-4 by the mouse cells. Finally, the adjunct therapy of ozonized sunflower oil and the drug Glucantime® is effective in eliminating *Leishmania amazonensis* parasites, both *in vitro* and *in vivo*, promoting the healing of skin lesions caused by leishmaniasis. Thus, the use of ozonized oil as an adjuvant provides a shorter treatment time for patients, who will consequently be less exposed to the adverse effects of standard long-term treatment.

KEY WORDS: ozonotherapy, anti-*Leishmania* activity, skin lesions.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral:.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas	22
3.2 Leishmanioses	23
3.3 Ozonioterapia	26
3.4 Papel dos macrófagos na cicatrização de feridas	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	31
4.2 Parasitas.....	31
4.3 Animais.....	31
4.4 Óleo ozonizado.....	31
4.5 Mensuração dos níveis de ozônio.....	32
4.6 Inoculação dos parasitas	33
4.7 Procedimento experimental 1	33
4.8 Administração do tratamento	34
4.9 Mensuração da lesão.....	34
4.10 Contagem de leucócitos.....	34
4.11 Esfregaço da borda da lesão (Imprint) da pata lesionada – Carga parasitária I ..	34
4.12 Análise histológica	35
4.13 Cultura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> da pata lesionada – Carga parasitária II.....	36
4.14 Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos	36
4.15 Obtenção de linfonodos poplíteos de camundongos	37
4.16 Avaliação da produção de óxido nítrico.....	37
4.17 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade).....	38
4.18 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> do óleo de girassol ozonizado sobre formas promastigotas <i>in vitro</i>	39
4.19 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> do óleo de girassol ozonizado sobre formas amastigotas <i>in vitro</i>	39
4.20 Dosagem de citocinas.....	40
4.21 Procedimento experimental 2.....	41
4.22 Análise Estatística.....	41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Dosagem do óleo ozonizado.....	42
5.2 Viabilidade celular.....	43
5.3 Produção de óxido nítrico (NO).....	45
5.4 Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> do óleo ozonizado de girassol sobre formas promastigotas <i>in vitro</i>	46
5.5 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> do óleo ozonizado de girassol sobre formas amastigotas <i>in vitro</i>	48
5.6 Produção de NO por macrófagos contendo formas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	50
5.7 Produção de TNF- α por macrófagos contendo formas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	51
5.8 Evolução das lesões.....	52
5.9 Contagem de leucócitos.....	58
5.10 Esfregaço da borda da lesão (Imprint) da pata lesionada – Carga parasitária I ..	59
5.11 Cultura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> da pata lesionada – Carga parasitária II.....	63
5.12 Análise Histológica.....	65
5.13 Dosagem de óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais e por células totais de linfonodos de camundongos submetidos ao tratamento com óleo ozonizado de girassol	69
5.14 Dosagem de citocinas.....	73
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS	77
8. ANEXOS.....	89
ANEXO I.....	89
ANEXO II.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* que receberam intervenção medicamentosa ou não no período de 30 dias.....34

Tabela 2. Porcentagem de macrófagos contendo amastigotas de *L. amazonensis* sobre o total de macrófagos peritoneais de camundongos, tratados in vitro com RPMI (controle negativo), Glucantime® (controle positivo), controle do óleo (CO) e concentrações de óleo de girassol ozonizado de 0,625 a 40 µg/mL, diluídos e meio RPMI e porcentagem de macrófagos infectados contendo 1, 2 3 ou mais parasitas. Valores em porcentagem (%)......52

Tabela 3. Quantidade de parasitas presentes na borda da lesão em Unidades Leishman-Donovan (LDU) – Procedimento experimental 1.....63

Tabela 4. Quantidade de parasitas presentes na borda da lesão em Unidades Leishman-Donovan (LDU) - Procedimento experimental 2.....63

Tabela 5. Diluição da cultura de fragmentos das patas infectadas com *L. amazonensis* em meio 199. Os valores apresentados são a média dos títulos de quatro unidades experimentais por grupo – Procedimento experimental 1.....66

Tabela 6. Contagem de promastigotas da cultura de patas lesionadas de camundongos infectados com *L. amazonensis*, diluição 1:2, resultados em número de células $\times 10^5$. OG - tratado com óleo não ozonizado e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - não tratado. *Animal excluído dos testes - Procedimento experimental 1.....67

Tabela 7. Diluição da cultura de fragmentos das patas infectadas com *L. amazonensis* em meio 199. Os valores apresentados são a média dos títulos de quatro unidades experimentais por grupo – Procedimento experimental 2.....67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mensuração mensal da dose de ozônio em óleo de girassol ozonizado no período de 4 meses. Os valores apresentados são a média \pm SEM (erro padrão da média) de quatro experimentos independentes, sem repetição. Resultados significativamente diferentes em relação ao mês 1: * $p < 0,05$43

Figura 2. Efeito do óleo de girassol ozonizado sobre a viabilidade celular de macrófagos murinos em 24 horas de tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes, em triplicata.....45

Figura 3. Efeito do óleo de girassol ozonizado sobre a viabilidade celular de macrófagos murinos em 24 e 48 horas de tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes, em triplicata. Significativamente diferente do controle negativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$46

Figura 4. Efeito do óleo de girassol ozonizado sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos 24 e 48 horas de exposição ao tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes, em triplicata. Significativamente diferente do controle negativo: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$48

Figura 5. Contagem de *L. amazonensis* em meio de cultura após 24h (a), 48 h (b), 72h (c) e 96h (d), submetidos a tratamento com óleo de girassol ozonizado e não ozonizado (controle do óleo), Glucantime® (controle positivo) e meio 199 (controle negativo). Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. Significativamente diferente do controle negativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Significativamente diferente do controle do óleo: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$50

Figura 6. Macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à infecção *in vitro* por parasitas de *L. amazonensis* e tratados com RPMI, Glucantime®, óleo de girassol ozonizado e não ozonizado: (a) macrófago não infectado, (b) presença de um parasita, (c) presença de 2 parasitas e (c) presença de mais do que 3 parasitas intramacrófagos, as inclusões parasitárias estão indicadas pelas setas.....53

Figura 7. Efeito do tratamento com Glucantime®, óleo de girassol ozonizado e não ozonizado sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* após 48 horas de exposição ao tratamento. Os valores apresentados são a média ± SEM de três experimentos independentes, em triplicata.....54

Figura 8. Efeito do tratamento com Glucantime®, óleo de girassol ozonizado e não ozonizado sobre a produção de TNF- α por macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* após 48 horas de exposição ao tratamento. Os valores apresentados são a média ± SEM de três experimentos independentes, em triplicata.....55

Figura 9. Espessura das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, em milímetros. Os valores apresentados são a média ± SEM de quatro unidades experimentais por grupo. a) Procedimento experimental 1: ozonização do óleo por 30 minutos e 2 horas: significativamente diferente do controle não tratado (NT): * p <0,05; b) Procedimento experimental 2: ozonização do óleo por 8 horas: significativamente diferente de G, OzG e Oz: * p <0,05; significativamente diferente de OzG: # p <0,05.....56

Figura 10. Evolução de lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos Balb/c ao longo de 30 dias – Procedimento experimental 1.....58

Figura 11. Evolução de lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos Balb/c ao longo de 30 dias – Procedimento experimental 2.....59

Figura 12. Número de leucócitos sanguíneos de camundongos infectados com *L. amazonensis* no início (a) e após trinta dias de tratamento (b). OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, G – grupo tratado com Glucantime®, OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, NT – grupo não tratado. Os valores apresentados são a média ± SEM de quatro unidades experimentais por grupo. Significativamente diferente do controle (NT): ● p<0,05. Significativamente diferente de OG: *** p<0,001. Significativamente diferente entre os grupos no início e final do tratamento: # p<0,05 e ## p<0,01.....61

Figura 13. Número de leucócitos sanguíneos de camundongos infectados com *L. amazonensis* no início (c) e após trinta dias de tratamento (d). OG – grupo

tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, G – grupo tratado com Glucantime®, OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, NT – grupo não tratado. Os valores apresentados são a média ± SEM de quatro unidades experimentais por grupo. Significativamente diferente do controle não tratado (NT): * p<0,05.....62

Figura 14. Esfregaço da borda das lesões causadas por *L. amazonensis* na pata de camundongos, corados por Giemsa (imprint), leitura feita em microscópio convencional no aumento de 1000x: (a) OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, (b) G – grupo tratado com Glucantime®, (c) OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, (d) Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, (e) NT – grupo não tratado. - Procedimento experimental 1.....64

Figura 15. Esfregaço da borda das lesões causadas por *L. amazonensis* na pata de camundongos, corados por Giemsa (imprint), leitura feita em microscópio convencional no aumento de 1000x: (a) OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, (b) G – grupo tratado com Glucantime®, (c) OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, (d) Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, (e) NT – grupo não tratado - Procedimento experimental 2.....65

Figura 16. Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E, no aumento de 1000x: (a) OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, (b) G - tratado com Glucantime®, (c) OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, (d) Oz - tratado com óleo ozonizado e (e) NT – não tratado - Procedimento experimental 2.....69

Figura 17. Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E, no aumento de 400x: (a) OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, (b) G - tratado com Glucantime®, (c) OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime® (setas indicando aumento da camada granulosa), (d) Oz - tratado com óleo ozonizado e (e) NT – não tratado - Procedimento experimental 2.....71

Figura 18. Espessura da epiderme da pata infectada com *L. amazonensis* de animais infectados e tratados. OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, G – grupo tratado com Glucantime®, OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, NT – grupo não tratado. Significativamente diferente do controle não tratado (NT): * p<0,05, **** p<0,0001. Significativamente diferente de Oz: ## p<0,01, ###

p<0,001, #### p<0,0001. – Procedimento experimental
 2.....72

Figura 19. Contagem de leucócitos de lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos. OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, G – grupo tratado com Glucantime®, OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, NT – grupo não tratado. Significativamente diferente do controle não tratado (NT): * p<0,05, ** p<0,01. Significativamente diferente de OG: # p<0,05 – Procedimento experimental
 2.....73

Figura 20. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante dos macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 24 h de tratamento (a) e após 48 h de tratamento (b). OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - sem tratamento. Significativamente diferente do controle não tratado (NT) - RPMI: # p<0,5 e ## p<0,01. Significativamente diferente dentro do grupo: *** p<0,001 e **** p<0,0001 – Procedimento experimental
 1.....74

Figura 21. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante dos macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 24 h de tratamento (c) e após 48 h de tratamento (d). OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - sem tratamento. Significativamente diferente do controle não tratado (NT) - RPMI e LPS: # p<0,5. Significativamente diferente dentro do grupo: * p<0,05, ** p<0,01 – Procedimento experimental
 2.....75

Figura 22. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante de linfonodos poplíteos de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 48 h de tratamento. OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - sem tratamento. Significativamente diferente de Oz - RPMI: # p<0,05. Significativamente diferente do controle não tratado (NT) – ASL: + p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 - Procedimento experimental
 1.....76

Figura 23. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante de linfonodos poplíteos de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 48 h de tratamento. OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com

Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - sem tratamento. Significativamente diferente de G - RPMI: # $p < 0,05$. Significativamente diferente intragrupo: * $p < 0,05$ - Procedimento experimental

2.....76

Figura 24. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante de linfonodos poplíteos de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 48 h de tratamento. G1 - tratado com óleo controle e Glucantime®, G2 - tratado com Glucantime®, G3 - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, G4 - tratado com óleo ozonizado e G5 - sem tratamento. Significativamente diferente de G4: # $p < 0,5$. Significativamente diferente de G5: * $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ - Procedimento experimental

2.....69

Figura 25. Dosagem de citocinas, por ELISA, a partir do sobrenadante de linfonodos poplíteos e macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis*. a) Produção de IL-4; b) Produção de TNF – α ; c) Produção de IFN – γ . Grupos: OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT – não tratado. Significativamente diferente do grupo não tratado (NT) – RPMI: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$. Significativamente diferente do grupo não tratado (NT) - ASL: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ - Procedimento experimental

2.....77

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são enfermidades causadas por agentes infecciosos ou parasitas, consideradas endêmicas em populações de baixa renda, afetando cerca de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo. Essas enfermidades representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida, devido a investimentos reduzidos em pesquisas e produção de medicamentos.

As leishmanioses fazem parte da lista de DTNs elaborada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). É um grupo de doenças endêmicas em mais de 8 países da África, Ásia, sul da Europa e América Latina, com prevalência estimada em cerca de 12 milhões de casos ao redor do mundo.

Essas doenças são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidas através da picada de flebotomíneos infectados. Mais de 20 espécies do parasita são responsáveis por causar a doença em humanos, sendo que o resultado clínico da infecção é determinado pelas espécies de *Leishmania*, fatores de virulência do vetor e resposta imune do hospedeiro, resultando em duas formas principais, a Leishmaniose Cutânea (LC) e a Leishmaniose Visceral (LV).

A LC é a forma mais comum da doença. Causa lesões que deixam cicatrizes ao longo da vida, é incapacitante e se tornou um grande problema de saúde pública. As características iniciais da lesão podem ser inespecíficas, com formação de eritema e endurecimento no local da picada, podendo evoluir para úlceras profundas e deformantes.

Atualmente há uma limitada disponibilidade de medicamentos para o tratamento dessas doenças. Quanto ao tratamento cutâneo, o objetivo é acelerar a cicatrização e prevenir a progressão da doença e a escolha dos medicamentos depende do tamanho e localização da lesão, do número de lesões e do potencial de disseminação. Os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como tratamento padrão desde 1929.

O tratamento parenteral é utilizado para a doença cutânea grave, no entanto, os antimoniais sistêmicos estão associados à considerável toxicidade e há relatos de resistência emergente dos parasitas de *Leishmania*. Diante disso, faz-se necessária a pesquisa por novas drogas antiparasitárias e substâncias que

possam auxiliar no tratamento das várias formas de leishmaniose, proporcionando a melhoria dos sintomas e o desaparecimento das lesões com ausência de cicatrizes, no caso da manifestação cutânea.

O ozônio (O_3) tem sido utilizado empiricamente como agente terapêutico clínico para o tratamento de feridas crônicas na pele. Os efeitos benéficos do O_3 na cicatrização de feridas podem ser devidos à diminuição da infecção, por matar o agente causador, melhorando a cicatrização da ferida dérmica ou ao aumento da tensão de oxigênio pela exposição ao O_3 na área afetada.

Além disso, esse composto apresenta poucos efeitos adversos comparados aos medicamentos atualmente disponíveis. Nesse contexto, a verificação da eficiência do ozônio como uma alternativa no tratamento das lesões cutâneas causadas pela leishmaniose se torna útil, proporcionando uma possível melhoria na qualidade de vida dos pacientes sob tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a eficiência do tratamento utilizando óleo de girassol ozonizado sobre lesões cutâneas causadas pelo parasita *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em modelo animal.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação do óleo de girassol ozonizado na eliminação dos parasitas de *L. amazonensis in vitro*, verificando ainda a seletividade do tratamento com relação aos parasitas e células de camundongos;
- Avaliar as condições de espessura da pata infectada e tamanho da lesão para os diferentes grupos infectados durante o período de tratamento e, após o final desse período, avaliar as lesões por parâmetros histológicos e de quantidade de parasitas;
- Avaliar a produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais e linfonodos drenantes murinos frente à infecção por *L. amazonensis in vivo* submetidos a tratamento com óleo ozonizado;
- Analisar a produção da citocina Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) por macrófagos peritoneais de animais infectados e tratados e por macrófagos infectados com *L. amazonensis in vitro*.
- Analisar a produção das citocinas Interferon gama (IFN- γ) e Interleucina 4 (IL-4) por células totais de linfonodos drenantes de animais infectados e tratados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) como doenças endêmicas e epidêmicas crônicas, que têm um impacto negativo significativo sobre a vida das populações mais pobres, permanecendo criticamente negligenciadas na agenda global de saúde pública (WHO, 2018).

Essas doenças afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo e estima-se que atinjam cerca de 2 bilhões na virada do milênio, com um ônus coletivo equivalente ao HIV/AIDS, tuberculose ou malária (ENGELS; ZHOU, 2020). Elas são consequências diretas das más condições ambientais e socioeconômicas a que grande parte das populações atingidas são submetidas, como falta de água potável, saneamento básico e condições adequadas de moradia além da proximidade com insetos e animais portadores de doenças (SILVA et al., 2017).

As DTNs causam importantes acúmulos locais de doenças, mas individualmente nenhuma delas representa uma prioridade global em termos de número de pessoas afetadas ou anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) perdidos (ENGELS; ZHOU, 2020). Nos piores casos, as DTNs podem matar os indivíduos afetados, embora com mais frequência elas causem uma variedade de deficiências e morbidades que são frequentemente crônicas e irreversíveis. Essas deficiências, por sua vez, acabam com a capacidade de atividade econômica e geram custos significativos de assistência médica para aqueles que já estão com os níveis mais baixos de renda, com outros efeitos relacionados à saúde mental e ao bem-estar social (HAMILL et al., 2019).

A maioria das drogas utilizadas no tratamento das DTNs são antigas e frequentemente têm efeitos colaterais indesejáveis. Infelizmente, as principais companhias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de novas drogas candidatas ou vacinas para DTNs, uma vez que a população alvo, apesar de extremamente grande, é quase que exclusivamente oriunda de países em

desenvolvimento com baixo status socioeconômico e, portanto, incapazes de pagar pelos medicamentos (ONG et al., 2019).

Segundo a lista da OMS existem 21 DTNs em todo o mundo, sendo que cada país possui pelo menos uma delas de forma endêmica. As infecções podem ser causadas por vírus, bactérias, protozoários ou helmintos. Dentre as patologias causadas por protozoários as leishmanioses recebem destaque (WHO, 2018). No Brasil, as DTNs mais frequentes são leishmanioses, hanseníase, tuberculose, dengue, doença de Chagas e esquistossomose (SILVA et al., 2017).

No que diz respeito às estratégias de combate às DTNs, um novo roteiro de 2021 a 2030 será lançado pela OMS e os compromissos da Declaração de Londres sobre DTNs precisarão ser renovados. Esse novo roteiro deve ampliar ainda mais o potencial de eliminação dessas doenças, além de orientar a integração das DTNs aos sistemas nacionais de saúde (ENGELS; ZHOU, 2020).

3.2 Leishmanioses

Como dito anteriormente, as leishmanioses são um grupo de doenças classificadas pela OMS como DTNs (WHO, 2017). As doenças são generalizadas nas áreas tropicais e subtropicais e estão presentes em quase 100 países nos cinco continentes. São endêmicas em algumas das regiões mais pobres do mundo onde, aproximadamente, 350 milhões de pessoas correm risco de infecção (MÜLLER et al., 2018).

Essas doenças não estão presentes apenas em países de baixa e média renda. Vinte e cinco dos 53 países da região europeia da OMS são endêmicos para a leishmaniose cutânea e 27 são endêmicos para a leishmaniose visceral (GLANS et al., 2018). As leishmanioses afetam atualmente pelo menos 12 milhões de pessoas, com uma incidência estimada de 2 milhões de casos anuais em 88 países. A OMS estima ainda que entre 700 mil e um milhão de casos novos da forma cutânea e 50 a 90 mil novos casos da forma visceral ocorram em todo o mundo a cada ano (WHO, 2018).

Os parasitas são transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados, conhecidos como mosquito-palha, e 98 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e

Lutzomyia têm sido descritas como vetores, comprovados ou suspeitos, para a leishmaniose humana. Alguns flebotomíneos possuem uma variedade de hospedeiros, incluindo canídeos e roedores, enquanto outros se alimentam principalmente de sangue humano. Conseqüentemente, as leishmanioses são classificadas como antropozoonoses (STEVERDING, 2017).

Animais infectados podem desenvolver a doença sintomática, ou podem atuar como reservatórios assintomáticos. Os cães são frequentemente infectados e são importantes hospedeiros oportunistas que podem facilitar a disseminação da doença entre as populações (RISUEÑO et al., 2018).

A doença pode assumir várias formas diferentes em humanos. As mais comuns são a Leishmaniose Cutânea (LC) (local ou difusa), que causa úlceras cutâneas, a Leishmaniose Mucocutânea (LMC), que afeta as membranas mucosas da boca, nariz e garganta e pode causar desfiguração facial e a Leishmaniose Visceral (LV), que afeta órgãos internos, geralmente baço, fígado e medula óssea (MÜLLER et al., 2018). A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a forma mais grave e é potencialmente fatal (GRIENSVEN; DIRO, 2019).

Das 30 espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos, aproximadamente 20 podem causar infecção humana. Estas incluem os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, que abrangem os complexos *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*), *L. mexicana* (*L. mexicana* e *L. amazonensis*), *L. tropica* (*L. tropica* e *L. aethiopica*), *L. major* e complexo de *L. braziliensis* (*L. braziliensis* e *L. peruviana*), entre outros (AUWERA; DUJARDINA, 2015).

O ciclo de vida e transmissão por parasitas de *Leishmania* ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada pica o homem e regurgita as formas promastigotas sobre a pele lesionada. Essas formas são fagocitadas por macrófagos e, no seu interior se diferenciam em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária. As formas amastigotas são liberadas pela ruptura dos macrófagos, sendo capazes de infectar novas células. Elas também podem ser absorvidas por um flebotomíneo não infectado que adquire o parasita ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, através da ingestão de amastigotas livres ou intramacrofágicas no tecido subcutâneo (ANVERSA et al., 2018).

Existe um arsenal limitado de drogas relativamente antigas no tratamento das leishmanioses: antimoniais trivalentes ou pentavalentes, anfotericina B (livre ou lipossômica), paromomicina e miltefosina. Todos esses agentes podem causar efeitos adversos potencialmente graves e o uso prolongado pode levar à resistência por parte dos parasitas (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

Os pacientes diagnosticados com LC nem sempre recebem quimioterapia, pois a maioria das lesões são autolimitadas. No entanto, a terapia medicamentosa pode acelerar a cicatrização, reduzir a formação de fibrose e prevenir a progressão para formas mais graves ou a transmissão para outras pessoas (ARONSON; JOYA, 2019).

O fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil é o antimoniato de meglumina, comercializado como Glucantime®. Contudo, sua utilização é questionável em razão de sua toxicidade, graus de resistência do parasita, tempo de tratamento, custo elevado e apenas a via parenteral para aplicação (SANTOS et al., 2019).

A toxicidade do antimonial é atribuída à sua ligação aos grupos sulfidril (-SH), modificando a estrutura terciária das proteínas e os sítios ativos de inúmeras enzimas. Como resultado, sinais de intolerância ou intoxicação podem aparecer, como alterações de temperatura, artralgia, vômitos, tosse seca e erupção cutânea. A intoxicação ocorre mesmo após a interrupção do tratamento e pode afetar o coração, fígado, rim, pâncreas e sistema circulatório. A gravidade dos sinais clínicos está relacionada à dose total administrada. A nefrotoxicidade associada ao fármaco decorre de infecções tubulares, necrose ou doença glomerular ligada a depósitos de complexos imunes devido à morte parasitária (GONZÁLEZ et al., 2019).

Diante dessas dificuldades, a pesquisa por novas drogas e tratamentos alternativos antiparasitários contra diferentes formas de leishmaniose, com menor toxicidade para o usuário, facilidade de aplicação e com custo razoável, continua sendo uma prioridade clínica fundamental (ANVERSA et al., 2018).

3.3 Ozonioterapia

O ozônio (O_3) é uma molécula inorgânica altamente reativa. É uma parte natural da atmosfera e pode ser produzido por geradores de ozônio. Embora essa molécula tenha sido descoberta em meados do século XIX, seu uso medicinal só foi desvendado durante as últimas décadas (WANG et al., 2018). O ozônio é um potente agente microbicida, possuindo propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antiparasitárias (ZARGARAN; FATAHINIA; MAHMOUDABADI, 2017).

Várias terapias utilizando o ozônio mostraram benefícios substanciais que abrangem uma grande variedade de doenças agudas e crônicas (FERNÁNDEZ et al., 2016; LIU et al., 2017; PAOLONI et al., 2009). A função do O_3 compartilha semelhanças com a de um pró-fármaco, pois é modificado ao reagir com moléculas para criar substratos mais ativos, estimulando, assim, uma cascata endógena de respostas (SMITH et al., 2017).

O ozônio tem sido utilizado empiricamente como agente terapêutico clínico para o tratamento de feridas crônicas, como úlceras tróficas, úlceras isquêmicas e feridas diabéticas. Há relatos de que a exposição ao O_3 está associada à ativação do fator de transcrição do fator nuclear κB (NF- κB), isso é importante para regular as respostas inflamatórias e, eventualmente, todo o processo de cicatrização da ferida (KIM et al., 2009).

A ativação de NF- κB pode ocorrer em resposta a uma variedade de estímulos de patógenos e também durante a cicatrização de feridas, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α (GUPTA et al., 2010; MA et al., 2018). Essas citocinas e outros fatores inflamatórios, liberados por meio da ativação dessa via, desempenham um papel protetor no estágio inicial da invasão do microrganismo, através da migração de macrófagos e outras células imunes aos tecidos da ferida (NA et al., 2016; THOMA; LIGHTFOOT, 2018). Além disso, durante a cicatrização, a ativação de NF- κB promove a proliferação de células epiteliais, facilitando, assim, o processo de reepitelização (BEN-NERIAH; KARIN, 2011).

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). 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 na 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 portaria 702 do Ministério da Saúde (MS), regulamentou a ozonioterapia como prática integrativa para os pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) em algumas situações muito específicas e sob caráter experimental e alternativo (BRASIL, 2018). Observa-se entre os benefícios dessa terapia, reduções importantes no tempo de recuperação dos pacientes, maior efetividade e maior adesão, bem como, menor custo total do tratamento (SEVERO, 2020).

Um medicamento tópico eficaz seria valioso na LC, oferecendo um tratamento seguro e não supervisionado a um custo razoável. Várias formas de tratamento tópico servem como drogas alternativas no controle da LC, à vista disso o ozônio pode ser um agente promissor (RAJABI et al., 2015).

O óleo ozonizado tem sido utilizado topicamente para o tratamento de feridas crônicas. Essas composições oleosas contendo ozônio têm a capacidade de fornecer oxigênio nascente nas profundezas da lesão, sem causar irritação primária da pele (KIM et al., 2009). Alguns autores avaliaram os efeitos dos óleos ozonizados no tratamento de infecções cutâneas e contra formas promastigotas *in vitro* de *Leishmania*, concluindo que esses compostos são altamente promissores e que o seu efeito é dependente da dose utilizada (RAJABI et al., 2015; ZANARDI et al., 2013).

Estudos biológicos e clínicos sobre os efeitos do O_3 na pele mostraram que o mesmo pode ser tóxico ou seguro, dependendo de sua dosagem, duração da exposição e capacidade antioxidante do tecido exposto (SOARES et al., 2019; VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005). Foi observado ainda, que o óleo ozonizado, durante a ozonização, retém o O_3 na forma de um ozonídeo estável e, quando aplicado a todos os tipos de infecções cutâneas, agudas e crônicas, libera lentamente O_3 que, em comparação com cremes convencionais

ozonizados, exibe eficaz atividade estimulante que leva à rápida cicatrização. Dessa maneira ele se torna um candidato para ser utilizado como uma alternativa de tratamento em lesões cutâneas causadas pela leishmaniose (BOCCI et al., 2015).

3.4 Papel dos macrófagos na cicatrização de feridas

Nas últimas décadas, embora tenham sido feitos avanços no entendimento da bioquímica da ferida crônica, o detalhamento de todos os eventos celulares que podem realmente afetar a cicatrização continua sendo um trabalho em andamento. Normalmente, no processo de cicatrização em geral, as fases de sinalização, tempo e regulação dos eventos celulares devem ocorrer de maneira sincronizada (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

A cicatrização de feridas é um processo multifásico que consiste em três estágios sobrepostos: inflamação, proliferação e remodelação de tecidos (BORGES et al., 2017). A inflamação começa no momento da lesão, os neutrófilos são as primeiras células a chegar, prevenindo infecções bacterianas e ativando queratinócitos, fibroblastos e células imunes. Cerca de 2 dias depois os monócitos chegam e se diferenciam em macrófagos, desbridando o tecido necrótico e controlando os patógenos, juntamente com os neutrófilos. O estágio de proliferação começa entre 2 a 10 dias após a lesão, quando os macrófagos adotam um fenótipo anti-inflamatório e pró-fibrótico, produzindo fatores de crescimento e o recrutamento de fibroblastos nas bordas da ferida (YUSSOF et al., 2012). Essas células formam o tecido de granulação, que funciona como substrato para migração, proliferação e diferenciação de queratinócitos durante a fase de reepitelização (SNYDER et al., 2016). A remodelação da matriz extracelular (MEC) começa de 2 a 3 semanas após a lesão e dura um ano ou mais. Nesse estágio, o conteúdo celular da ferida diminui e as fibras de colágeno da MEC são substituídas e reorganizadas em uma rede mais forte (BORGES et al., 2017).

Os macrófagos são células importantes nos processos inflamatórios e no reparo de feridas crônicas. Macrófagos são fagócitos mononucleares que podem ser formados durante a embriogênese, derivados do saco vitelino ou do fígado

fetal. São também recrutados do sangue e da medula óssea como monócitos, entrando nos tecidos sob condições inflamatórias. Eles assumem fenótipos e funções distintas, cruciais para a cura de diversos tipos de lesões do organismo (MINUTTI et al., 2017). Os macrófagos estão envolvidos na defesa do hospedeiro, no início e na resolução da inflamação, na produção de fatores de crescimento, na fagocitose, na proliferação celular e na restauração de tecidos nas feridas (SNYDER et al., 2016).

Os macrófagos quando polarizados em M1, também conhecidos como macrófagos ativados pela via clássica, estão envolvidos na resposta da célula T auxiliar 1 (Th1) à infecção. Eles produzem reagentes microbicidas e tumorocidas, como óxido nítrico (NO) ou espécies reativas de oxigênio (ERO). Já os macrófagos polarizados em M2, também conhecidos como macrófagos ativados pela via alternativa, são importantes no reparo tecidual, embora também estejam envolvidos na progressão de doenças infecciosas crônicas. Em suma, os macrófagos M1 induzem inflamação, regulando negativamente o processo de cicatrização precoce, produzindo IL-12, ao contrário dos macrófagos M2 que regulam positivamente o processo de cicatrização, em um processo mediado pela IL-10. Logo, o tipo de estímulo pode definir o ciclo de uma lesão, levando a piora ou melhora, dependendo da resposta dessas células. Sabe-se que o lipopolissacarídeo (LPS), presente em vários microrganismos, é uma molécula que ativa o macrófago pela via clássica (AMOROSO et al., 2012; FORMAN; TORRES, 2002; JUBAN; CHAZAUD, 2017; LEE, 2019).

Patógenos intracelulares, incluindo parasitas de *Leishmania*, desenvolveram maneiras de explorar a plasticidade celular, reprogramando a resposta imune da célula hospedeira em proveito próprio (MCMASTER et al., 2016). Para colonizar macrófagos, as promastigotas de *Leishmania* empregam fatores de virulência, incluindo lipofosfoglicano (GLP), para prejudicar os processos celulares (OSPINA; DESCOTEAUX, 2020). Analisando macrófagos derivados da medula óssea infectados *in vitro* com *L. amazonensis*, ou macrófagos recuperados de infecções *in vivo* de camundongos, foi demonstrado que as moléculas efetoras do parasita modificam a cromatina celular nas regiões promotoras de vários genes pró-inflamatórios relacionados ao NF-κB (KAMHAWI; SERAFIM, 2020).

A localização das amastigotas no interior de macrófagos faz com que o controle da infecção seja dependente da resposta imune mediada por células. A principal célula efetora da eliminação das amastigotas é o próprio macrófago, após sua ativação por linfócitos T auxiliares (ABBAS et al., 2019).

Como consequência das baixas taxas de cicatrização em feridas crônicas tratadas com tratamento padrão, muitas vezes é necessária uma terapia adjuvante (YUSSOF et al., 2012). Trabalhos iniciais sobre macrófagos na década de 1970 confirmaram que eles são críticos para a cicatrização de feridas (LEIBOVICH; ROSS, 1975) e recentemente foi relatado que o ozônio induz um aumento no número de macrófagos associados a um maior número de miofibroblastos, bem como neovascularização na fase proliferativa e regressão vascular na fase de remodelação de feridas em animais (SOARES et al., 2019).

Agentes sistêmicos contra as leishmanioses são caros e limitados a alguns medicamentos com eficácia inconsistente e efeitos colaterais inaceitáveis e não há tratamento para todas as formas da doença atualmente (MELO et al., 2016). Tendo em vista a importância da LC como uma doença potencialmente desfigurante, caracterizada pela formação de feridas crônicas e levando em consideração o papel desempenhado pelos macrófagos, juntamente com a potencial estimulação pela molécula de ozônio na resolução dessas lesões, esse trabalho busca avaliar a eficiência da ozonioterapia em feridas cutâneas causadas pela leishmaniose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

O uso de animais neste trabalho foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE (CEUA), sob o protocolo n° 01/21 - CEUA (ANEXO I).

4.2 Parasitas

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio 199 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) estéril, 5 µg/mL de hemina, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sendo também adicionado ocasionalmente 2% de urina masculina humana estéril. Os parasitas foram mantidos por meio de repiques semanais, a fim de manter a viabilidade das células.

4.3 Animais

Camundongos fêmeas Balb/c, oriundos do Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), com 6-8 semanas de vida, receberam dieta padrão em pellets e água *ad libitum*. Foram mantidos em caixas padrão em grupos de 5 animais, com ciclo de claro e escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram realizados em estrita conformidade com os princípios e diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

4.4 Óleo ozonizado

A ozonização foi feita conforme Moureu et. al., (2016), com modificações. Foi utilizado óleo de girassol comercial ao qual foi adicionado 10% de água destilada além de 6 gotas 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 30 minutos, 2 horas e 8 horas à uma taxa de 0,5 L/min (MOUREU et al., 2016).

4.5 Mensuração dos níveis de ozônio

Para mensurar os níveis de ozônio no óleo foram realizadas titulações iodométricas (titulação indireta de iodo). Na primeira, de acordo com Silva et al., (2011), utilizou-se 0,5 g de Iodeto de Potássio (KI) P.A. em Erlenmeyer contendo 20 mL de óleo, em seguida foi adicionado 1 mL de Ácido Clorídrico (HCl) 0,01 M e 2 mL de amido como indicador, essa mistura foi titulada com Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,02 mol/L (SILVA et al., 2011). A concentração de ozônio foi então calculada a partir da fórmula:

$$\frac{\text{Concentração Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times \text{Volume Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 48 \times 1000}{2 \times \text{Volume de óleo}}$$

Como a primeira titulação requer um volume grande de óleo ozonizado para a dosagem, optou-se por realizar uma segunda titulação, na qual a quantidade de amostra requerida é menor (0,5 g). Nesse método a concentração de ozônio foi obtida indiretamente por meio da medição dos valores de peróxido de hidrogênio no óleo. O procedimento foi 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 (CH_3COOH) e Clorofórmio (CHCl_3) 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 vagorosamente titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 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 (MARTINEZ et al., 2006). Os valores de peróxido (Pv) foram obtidos pela fórmula:

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

Onde V é o volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ em mL e W é o peso do óleo em gramas. Ao final da técnica, o Pv obtido, em mEq/kg, foi convertido em concentração de ozônio

em mg/g de óleo (SKALSKA et al., 2009). Visto que a densidade de óleos vegetais varia de 920 a 930 kg/m³ (SAHASRABUDHE et al., 2017), foi considerado 1g de óleo como sendo equivalente a 1 mL, obtendo-se, assim, a concentração de ozônio estimada em µg/mL de óleo.

Óleos de girassol ozonizados por 30 minutos, preparados em dias diferentes, foram submetidos a dosagem mensal de ozônio, durante 4 meses, para avaliação do tempo de permanência e porcentagem de diminuição do ozônio no óleo.

4.6 Inoculação dos parasitas

Para o desenvolvimento do modelo experimental da lesão de LC, foi feita a inoculação de uma suspensão de *L. amazonensis*, em fase estacionária de crescimento (5 dias de incubação), com aproximadamente 1×10^6 parasitas, na pata traseira esquerda. Os camundongos foram anestesiados com quetamina e xilazina (2:1) antes do procedimento.

4.7 Procedimento experimental 1

Os animais infectados com *L. amazonensis* foram divididos em 5 grupos e tratados conforme tabela 1.

Tabela 1. Grupos de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* que receberam intervenção medicamentosa ou não no período de 30 dias.

Grupos	Tratamento
Grupo 1 (OG)	Óleo não ozonizado local e Glucantime Intraperitoneal (IP)
Grupo 2 (G)	Glucantime IP
Grupo 3 (O ₂ G)	Óleo ozonizado local e Glucantime IP
Grupo 4 (O ₂)	Óleo ozonizado local
Grupo 5 (NT)	Não tratado

4.8 Administração do tratamento

O tratamento iniciou-se após o aparecimento das lesões, em torno de 8 semanas após a infecção. Para isso, 250 µL de óleo de girassol ozonizado ou não ozonizado foram aplicados sobre as lesões, gentilmente, com o auxílio de swabs, todos os dias, durante 30 dias. Os grupos submetidos ao tratamento com Glucantime® receberam a droga diariamente, por via intraperitoneal, na dose de 50 mg/Kg.

4.9 Mensuração da lesão

Uma vez por semana, durante o protocolo de tratamento, foi mensurada a espessura da pata em milímetros, com uso de um paquímetro. Também foram realizados registros fotográficos a fim de analisar a morfometria da lesão, avaliando, dessa forma, a cicatrização da ferida.

4.10 Contagem de leucócitos

Antes do início e ao final do tratamento foi efetuada a contagem dos leucócitos sanguíneos dos animais de todos os grupos. Após um pequeno corte na extremidade da cauda, o sangue periférico foi coletado e diluído 1/10 em líquido de Turk. Depois disso, as células foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer.

4.11 Esfregaço da borda da lesão (Imprint) da pata lesionada – Carga parasitária I

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados utilizando excesso de xilazina (30 mg/Kg) e quetamina (270mg/Kg). Posteriormente, a pata lesionada foi retirada e pesada, em seguida foi realizado um esfregaço em lâmina o qual foi corado pela metodologia de Giemsa. Ao microscópio foram contadas 1000 células conforme o protocolo de Chouhan et al., (2015), com a

carga parasitária sendo avaliada como Unidades Leishman-Donovan (LDU) (CHOUHAN et al., 2015), pela fórmula:

$$\text{LDU} = \text{Número de amastigotas} / (\text{Número de macrófagos} \times \text{peso do órgão (mg)})$$

4.12 Análise histológica

A técnica histológica utilizada seguiu o protocolo do laboratório de Histologia da UNIOESTE.

Após a eutanásia dos animais, as patas retiradas para os achados histológicos, foram fixadas com solução de formaldeído 10% em água destilada durante 24 horas. O material ficou em água corrente durante 48 horas e, posteriormente, foi estocado em 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 esse procedimento foi utilizada solução descalcificante (5% de ácido tricloroacético diluído em tampão PBS) durante 20 a 30 dias. Após a completa descalcificação, foi feita a inclusão do material em parafina (ANEXO II).

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, a lâmina foi desparafinada, hidratada e corada pela técnica de coloração Hematoxilina – Eosina (ANEXO II).

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 fotografados (Fotomicroscópio Olympus BX53) pelo menos dois cortes histológicos de cada pata, sendo escolhidos cinco locais aleatoriamente para as medições e contagens em cada uma das imagens.

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

Após a eutanásia dos animais, foi realizada a assepsia da pata com iodopovidona (PVPI) e retirado um fragmento superficial da lesão, com o auxílio de bisturi e pinça, o qual foi colocado em um microtubo contendo 550 µL de meio 199 previamente pesado. Após a adição do fragmento pesou-se novamente o tubo com a finalidade de 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, com agulha hipodérmica, cerca de 20 vezes, com cuidado e evitando pegar partes de tecido, após esse procedimento, depositou-se o conteúdo em tubo de 15 mL estéril onde foram adicionados mais 2 mL de meio 199.

Em uma placa de 96 poços foi adicionado ao primeiro poço 200 µL de meio 199 e 100 µL da suspensão, foi efetuada, então, uma diluição seriada, utilizando-se 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 B.O.D a 25°C. Ao primeiro dia e nas 4 semanas seguintes foi observada em microscópio invertido avaliando-se a titulação conforme a presença de formas promastigotas viáveis de *L. amazonensis*. Para o procedimento experimental 1 todas as titulações que apresentaram parasitas foram contadas em câmara de Neubauer.

4.14 Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos

Os macrófagos foram obtidos através da exposição do peritônio dos camundongos eutanasiados, com anterior assepsia, seguida de infusão de 10 mL de solução tampão fosfato salina (PBS) estéril a 4°C na cavidade peritoneal. Em seguida, realizou-se a massagem na região peritoneal para desprendimento 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 6 minutos, a 4°C.

O “pellet” de células obtido após centrifugação foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI contendo 10% de SFB. Foi realizada a contagem em câmara de Neubauer e o volume ajustado para a concentração de 2×10^5 células por poço, sendo estas então plaqueadas, em triplicata, em placas de 96 poços. Após a incubação por 2 horas, a 37°C sob 5% de dióxido de carbono (CO_2), foram efetuados os procedimentos específicos para cada dosagem.

4.15 Obtenção de linfonodos poplíteos de camundongos

Os linfonodos poplíteos drenantes da pata lesionada foram retirados dos animais assepticamente e o preparo do homogenato se deu da mesma forma que o fragmento da lesão, na análise da carga parasitária II (item 4.13). 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 então foram incubadas por 2h a 37°C a 5% de CO_2 . Após a incubação, adicionou-se aos poços meio RPMI e antígeno solúvel de *L. amazonensis* (ASL) a $50 \mu\text{g/mL}$, obtido por sonicação (RINGELMANN; HEYM, 1991). A placa foi incubada por 48 horas a 37°C a 5% de CO_2 , sendo o sobrenadante recolhido posteriormente para realização da dosagem de NO, IL-4 e IFN- γ .

4.16 Avaliação da produção de óxido nítrico

Para esta análise utilizou-se o método descrito por Green et al., (1982) com modificações (GREEN et al., 1982). As placas contendo os macrófagos peritoneais e as células totais de linfonodos, foram tratadas com LPS 100 ng/mL , ASL $50 \mu\text{g/mL}$, ou somente com meio RPMI como controle. As placas foram, então, incubadas a 37°C sob 5% de CO_2 por 24 e/ou 48 horas. A mensuração dos níveis de NO é realizada pela dosagem de nitrito no sobrenadante, por isso $100 \mu\text{L}$ do mesmo, de cada poço, foram utilizados para reagir com $100 \mu\text{L}$ do reagente de Griess (solução 1:1 de naftiletlenodiamino 0,1% (p/v) em ácido ortofosfórico 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 realizada a leitura em leitor de microplaca a 550 nm . Os dados

foram expressos em micro molar (μM) através da curva-padrão obtida com concentrações molares conhecidas de Nitrito de Sódio (NaNO_2) em meio RPMI.

4.17 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Para esta análise utilizou-se o método descrito por Mosmann, (1983) com modificações (MOSMANN, 1983). Os macrófagos foram plaqueados na concentração de 2×10^5 células por poço em placas de 96 poços que foram incubadas a 37°C sob 5% de CO_2 por 2 horas. Em seguida o sobrenadante foi retirado e as células utilizadas como controle receberam somente meio RPMI. As que foram utilizadas como controle do óleo receberam óleo não ozonizado (na mesma quantidade que a maior concentração de óleo contendo ozônio). A algumas células foi adicionado LPS 100 ng/mL e as demais receberam diferentes concentrações de óleo ozonizado diluído em meio RPMI (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20, 40, 80, 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$), todos em duplicata, utilizando-se a mesma quantidade de poços para cada tratamento. As células foram então incubadas a 37°C sob 5% de CO_2 por 24 e/ou 48 horas. Em seguida o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 200 μL de EBSS (solução balanceada de Eagle) com MTT (brometo de (3-metil-[4-5-48 dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) a 5 mg/mL, a placa então foi incubada a 37°C sob 5% de CO_2 por 3 horas.

Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos com 150 μl de Dimetilsulfóxido (DMSO). Aguardou-se, então, 10 minutos para a total solubilização dos cristais e foi realizada a leitura em leitor de microplaca a 550 nm. Os dados foram expressos em porcentagem do controle, (sendo considerado 100 % de viabilidade os poços contendo somente meio de cultura (controle)). As diferentes porcentagens obtidas dos compostos foram utilizadas para determinar a concentração citotóxica do óleo ozonizado necessária para causar a morte de 50% das células viáveis (CC_{50}). A CC_{50} foi determinada a partir de uma curva de regressão não linear feita no programa Graph Pad Prism 6.0®.

No primeiro experimento o óleo foi ozonizado por 30 minutos e as concentrações utilizadas foram até 40 $\mu\text{g/mL}$, já para o segundo, o óleo foi ozonizado por um período de 8 horas e acrescentou-se as concentrações de 80,

160 e 320 µg/mL, além disso, para este último experimento, todos os tratamentos com óleo ozonizado foram esterilizados por filtração (0,22 µm).

4.18 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do óleo de girassol ozonizado sobre formas promastigotas *in vitro*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em meio 199 foram contadas em câmara de Neubauer e o volume foi ajustado para obtenção de 1×10^5 células por poço, em placas de 24 poços. Adicionou-se diferentes concentrações de óleo ozonizado diluído em meio 199 (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 µg/mL), somente 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, em triplicata.

Alíquotas foram retiradas e diluídas em formalina 10% (1:10) para contagem em câmara de Neubauer após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento. Ao final, as contagens foram comparadas com os controles e foi, então, avaliada a inibição do crescimento de *L. amazonensis* frente às diferentes concentrações de óleo ozonizado. As contagens obtidas foram utilizadas para determinar a concentração citotóxica do óleo ozonizado necessária para inibir o crescimento de 50% dos parasitas (CI_{50}). A CI_{50} foi determinada a partir de uma curva de regressão não linear feita no programa Graph Pad Prism 6.0®. Dividindo-se a CC_{50} obtida na viabilidade celular pela CI_{50} foi obtido o índice de Seletividade (IS) do tratamento (PRAYONG; BARUSRUX; WEERAPREEYAKUL, 2008).

4.19 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do óleo de girassol ozonizado sobre formas amastigotas *in vitro*

Macrófagos peritoneais foram coletados conforme item 4.14, ajustados para uma concentração de 2×10^5 células por poço e plaqueados em placas de 24 poços, contendo lamínulas redondas estéreis em cada poço. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 3 horas para aderência dos macrófagos.

Após esse período foi preparado um inóculo de parasitas contendo 10 vezes o número de macrófagos, ou seja, 2×10^6 parasitas por poço. As placas

foram colocadas em estufa de CO₂ por 6 horas a 34°C para que os macrófagos fossem infectados pelos parasitas de *Leishmania*.

O meio de cultura foi então retirado e foram adicionadas aos poços diferentes concentrações de óleo ozonizado diluído em meio RPMI (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 µg/mL), meio RPMI como controle negativo, óleo não ozonizado diluído em meio RPMI na mesma quantidade que a maior concentração de óleo contendo ozônio e Glucantime® 300 µg/mL como controle positivo, em triplicata. As placas permaneceram em estufa de CO₂ a 37°C por 48 horas.

Após a incubação, o sobrenadante de cada poço foi coletado e acondicionado em microtubos para posterior análise da produção de NO e TNF-α. A seguir, as lamínulas contendo as células aderidas foram coradas por Giemsa e coladas em lâminas através da adição de 1 gota de PermOUNT®.

Ao final, as células foram contadas em microscópio convencional, avaliando-se a presença de formas amastigotas no interior dos macrófagos, obtendo-se assim a porcentagem de células infectadas com amastigotas sobre o número total de macrófagos para cada um dos tratamentos.

4.20 Dosagem de citocinas

A produção das citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-4 foram analisadas pelo método ELISA, por meio do kit da marca Peprotech®.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura, seladas e permaneceram à temperatura ambiente por 18 horas. Os poços foram então lavados 4 vezes com tampão de lavagem e foram adicionados 300 µL de tampão de bloqueio aos mesmos, deixando-se à temperatura ambiente por 1 hora.

Após as lavagens, os padrões de cada teste foram diluídos e plaqueados conforme a bula. Para análise de TNF-α foram adicionados os sobrenadantes dos experimentos com as células submetidas à infecção por amastigotas e dos macrófagos peritoneais dos animais infectados e tratados no procedimento experimental 2. Para análise de IFN-γ e IL-4 foram adicionados os sobrenadantes das células totais de linfonodos dos animais infectados e tratados

no procedimento experimental 2. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 2 horas. Após as lavagens os anticorpos de detecção foram adicionados aos poços e a placa ficou novamente em repouso à temperatura ambiente por 2 horas.

Depois desse período, os poços foram lavados e o conjugado contendo avidina foi adicionado, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após as lavagens foram adicionados 100 µL de substrato ABTS e deixou-se a placa em repouso até o desenvolvimento da coloração. As placas foram então lidas em leitor de microplacas a 405 e 650 nm. A diferença entre a maior e a menor absorbância foi utilizada para o cálculo de determinação das citocinas.

4.21 Procedimento experimental 2

Os animais infectados com *L. amazonensis* foram divididos em 5 grupos e tratados conforme tabela 1, o procedimento foi realizado de forma idêntica aos itens 4.7; 4.8; 4.9; 4,10; 4.11; 4.12 e 4.13. Porém, para esse procedimento o óleo de girassol utilizado foi ozonizado por um período de 8 horas.

4.22 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à estatística analítica para comparação das médias, através do teste de ANOVA e foi utilizado o teste de Tukey paramétrico, sendo adotado o nível de confiança de 95%, tendo significância valores de $p < 0,05$. Foi usado o programa GraphPad Prism®, versão 6.0 e Microsoft Excel, ambos para plataforma Windows 10 da Microsoft.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dosagem do óleo ozonizado

Sabendo que o ozônio é uma molécula relativamente estável quando introduzida em veículos oleosos (VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005), realizamos a dosagem mensal de 4 amostras de óleo de girassol, ozonizados por 30 minutos, em dias diferentes, como mostrado na Figura 1. A porcentagem de diminuição da concentração do primeiro para o último mês foi de 35%.

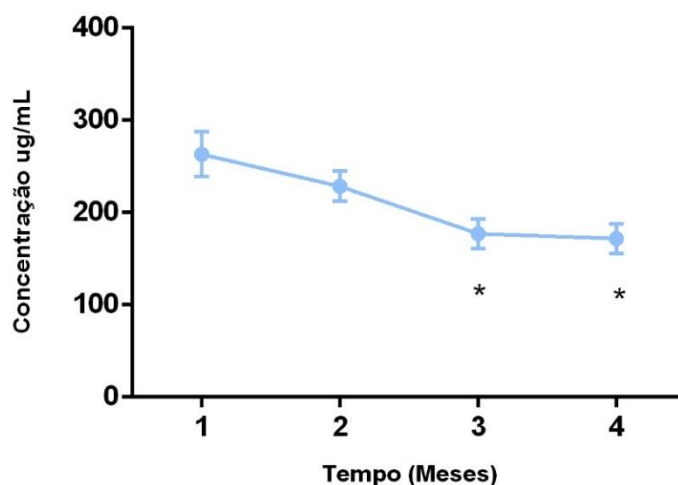


Figura 1. Mensuração mensal da dose de ozônio em óleo de girassol ozonizado no período de 4 meses. Os valores apresentados são a média \pm SEM (erro padrão da média) de quatro experimentos independentes, sem repetição. Resultados significativamente diferentes em relação ao mês 1: * $p < 0,05$.

Em nossos experimentos, houve diferença estatística significativa na concentração de O_3 do primeiro mês com relação ao terceiro e ao quarto mês. Por conseguinte, não houve diferença do primeiro para o segundo mês entre as dosagens do ozônio no óleo, portanto ele se manteve estável durante os 30 dias de tratamento. Cirlini et al., (2012) demonstraram que o óleo de girassol ozonizado é estável por pelo menos 6 meses à temperatura ambiente e, segundo Bocci et al., (2004), por até 2 anos se mantido sob refrigeração (BOCCI et al., 2004; CIRLINI et al., 2012).

Os resultados médios dos valores de peróxido (Pv) obtidos neste experimento foram de 3,70; 3,58; 2,78 e 2,69 mEq/kg, equivalentes às

concentrações de ozônio no óleo de 263,18; 228,58; 177,28 e 171,80 $\mu\text{g/mL}$. Vale ressaltar que para este experimento o óleo foi ozonizado por 30 minutos. Com relação ao óleo ozonizado por 8 horas, utilizado no tratamento dos animais, o Pv obtido foi de 898,0 mEq/kg, logo a concentração de ozônio no óleo foi de 57,27 mg/g, sendo estimada em 57.270 $\mu\text{g/mL}$ de óleo.

Geralmente o tratamento de lesões cutâneas se desenvolve em um período mais curto do que o testado (4 meses), como mostrado por Aghaei et al., (2019), em que pacientes com LC receberam tratamento com óleo de girassol ozonizado e Glucantime® por um período de 2 meses. Além disso, Yuniati et al., (2020) utilizaram ozônio oleoso e obtiveram redução no tamanho de lesões ocasionadas por diabetes em animais em um período de 14 dias. E ainda, ratos com lesões alérgicas foram tratados com óleo ozonizado mostrando resultados satisfatórios em apenas 7 dias (AGHAEI et al., 2019; LU et al., 2018; YUNIATI et al., 2020). Portanto, por meio da ozonização do óleo por um período prolongado, e, se o tratamento for ampliado, já que o O_3 se mantém estável, efeitos positivos no prognóstico das lesões provocadas pela LC podem ser alcançados.

5.2 Viabilidade celular

O ensaio colorimétrico de MTT é um ensaio quantitativo para a medição de células metabolicamente ativas. O MTT, que tem sua estrutura molecular em forma de anel, é clivado por uma enzima mitocondrial que dá origem aos cristais de formazan de coloração violeta. Essa clivagem é feita por todas as células vivas, metabolicamente ativas, mas não pelas células mortas ou por eritrócitos. Por esse motivo, a quantidade de formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células viáveis (VITRAL et al., 2008).

No primeiro experimento realizado, nossos resultados mostraram que em 24 horas de exposição houve clivagem e produção de formazan pelas células em todos os tratamentos, sem diferença estatística entre eles (Figura 2), inclusive na maior concentração de óleo ozonizado (40 $\mu\text{g/mL}$). A concentração necessária para inibir em 50% a viabilidade celular (CC_{50}) obtida foi > 60 $\mu\text{g/mL}$.

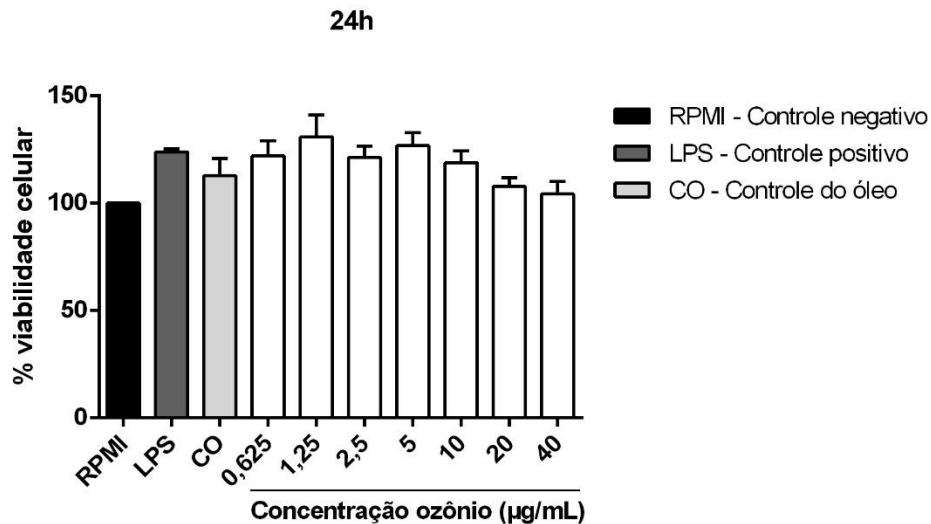


Figura 2. Efeito do óleo de girassol ozonizado sobre a viabilidade celular de macrófagos murinos em 24 horas de tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes, em triplicata.

Entretanto, para uma avaliação mais assertiva da concentração citotóxica do óleo ozonizado sobre os macrófagos, o experimento foi repetido com adição das concentrações de ozônio de 80, 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$ e foi realizado nos tempos de 24 e 48 horas.

Como observa-se na Figura 3, no tempo de 24 horas as concentrações de 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$ foram tóxicas para as células, já em 48 horas houve toxicidade a partir da concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$, além do controle do óleo. Em 48 horas a redução na viabilidade foi de 14% para a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, 26% para a de 80 $\mu\text{g/mL}$, 42% para a de 160 $\mu\text{g/mL}$ e 61% para 320 $\mu\text{g/mL}$. A CC_{50} obtida foi de 84,21 $\mu\text{g/mL}$.

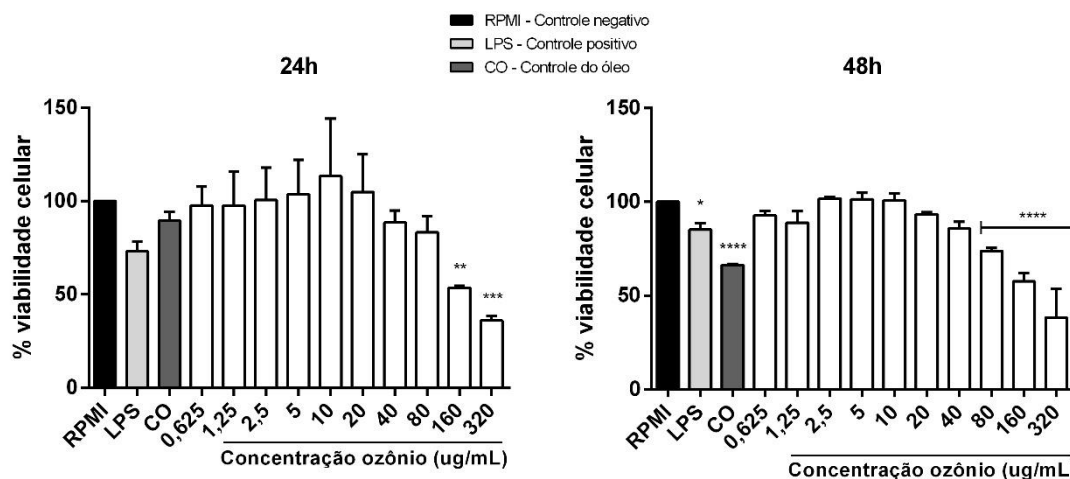


Figura 3. Efeito do óleo de girassol ozonizado sobre a viabilidade celular de macrófagos murinos em 24 e 48 horas de tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes, em triplicata. Significativamente diferente do controle negativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Esses resultados de toxicidade se devem, provavelmente, ao maior tempo de exposição ao tratamento (48h). Para o preparo do controle do óleo, foi utilizado o mesmo volume de óleo não ozonizado que foi usado na concentração de 320 $\mu\text{g/mL}$, por este volume ser maior, por mais que não haja O_3 , a consistência oleosa do meio em que as células foram mantidas pode ter interferido na viabilidade das mesmas, já que o meio oleoso impede uma correta oxigenação e dificulta o consumo dos nutrientes necessários para a sobrevivência das células (VAZ et al., 2011).

5.3 Produção de óxido nítrico (NO)

O NO é um importante composto produzido pelas células imunes em resposta a injúrias e inflamações. Quanto maior o nível de NO, maior a toxicidade do tratamento para o agente causador da doença em questão. Do mesmo modo, a baixa produção de NO expressa uma menor toxicidade, sugerindo que o tratamento não foi capaz de causar prejuízos aos microrganismos (VITRAL et al., 2008).

Sabendo que o ozônio é um agente imunomodulador que pode atuar na via do NO, ocasionando um aumento ou diminuição na produção do mesmo, dependendo da dose utilizada (SAGAI; BOCCI, 2011), dosamos essa substância

frente a diferentes concentrações de óleo ozonizado nos tempos de 24 e 48 horas. Para tanto, utilizou-se o sobrenadante do experimento da viabilidade celular, no qual foram acrescentadas as concentrações de 80, 160 e 320 µg/mL. Em 24 horas somente as células tratadas com LPS produziram uma quantidade significativa de NO, já em 48 horas essa produção ocorreu também nos macrófagos tratados com a maior concentração de óleo ozonizado (Figura 4). O NO, apesar de ser uma molécula efetiva no combate a infecções, em excesso pode ser prejudicial às células, como pode-se observar na concentração de 320 µg/mL, a qual foi tóxica no experimento de viabilidade celular.

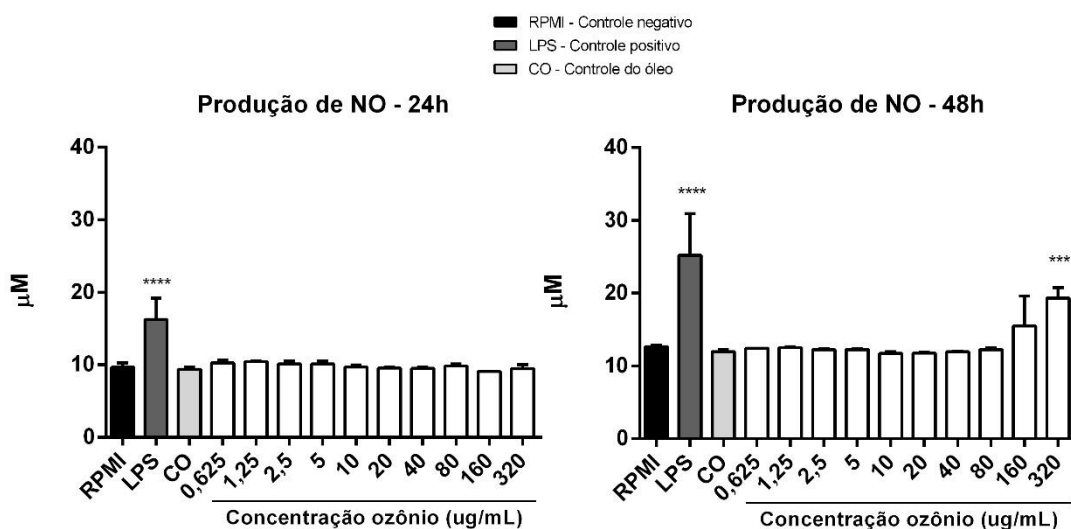


Figura 4. Efeito do óleo de girassol ozonizado sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos 24 e 48 horas de exposição ao tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes, em triplicata. Significativamente diferente do controle negativo: *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.4 Determinação da atividade anti-*Leishmania* do óleo ozonizado de girassol sobre formas promastigotas *in vitro*

As formas promastigotas de *Leishmania*, quando em cultura, apresentam uma curva de crescimento progressiva, atingindo seu pico máximo no quarto ou quinto dia. Os resultados das contagens dessas formas em meio 199 ou sob tratamento com Glucantime®, óleo não ozonizado ou controle do óleo e em concentrações crescentes de óleo com ozônio podem ser visualizados na Figura 5.

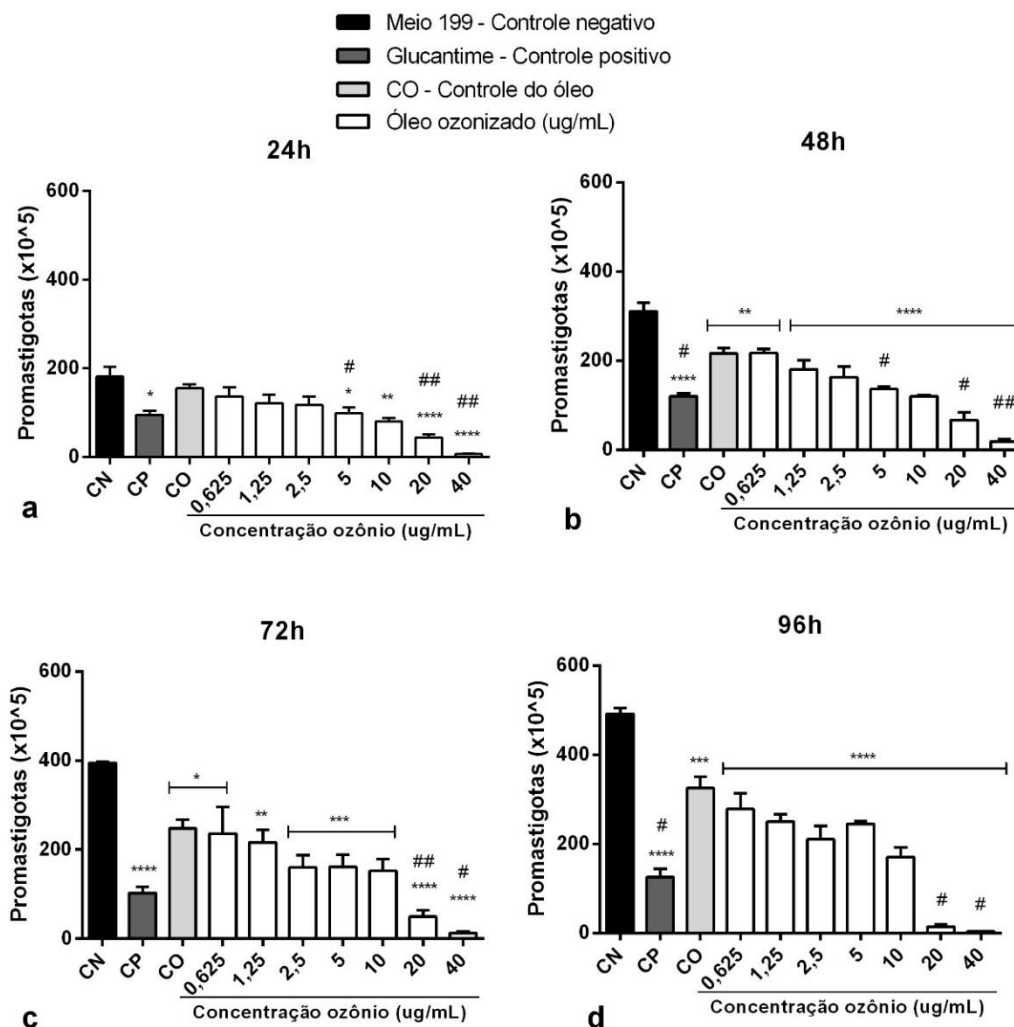


Figura 5. Contagem de *L. amazonensis* em meio de cultura após 24h (a), 48 h (b), 72h (c) e 96h (d), submetidos a tratamento com óleo de girassol ozonizado e não ozonizado (controle do óleo), Glucantime® (controle positivo) e meio 199 (controle negativo). Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. Significativamente diferente do controle negativo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Significativamente diferente do controle do óleo: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$.

Em 24 horas, o óleo ozonizado promoveu diminuição no crescimento dos parasitas a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$, já a partir de 48h de tratamento, o óleo com ozônio ocasionou a inibição do crescimento em todas as concentrações quando comparado com as células tratadas apenas com meio, o qual apresentou crescimento exponencial.

Esses dados sugerem que o óleo ozonizado foi capaz de inibir o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo que as

maiores taxas de inibição foram obtidas após 96h de tratamento, inclusive apresentando uma inibição significativa das concentrações de 20 e 40 µg/mL em comparação com o medicamento de referência.

O controle do óleo também apresentou uma inibição do crescimento dos parasitas a partir de 48 horas de tratamento, como no caso da viabilidade celular dos macrófagos peritoneais de camundongos, esse fato se explica pela diminuição da densidade do meio quando o óleo é acrescentado, o que torna mais difícil o consumo dos nutrientes, prejudicando o crescimento tanto dos macrófagos quanto dos parasitas (VAZ et al., 2011). Entretanto, as maiores concentrações de óleo ozonizado apresentaram maior inibição do crescimento dos parasitas em comparação com o óleo não ozonizado, evidenciando o poder microbicida do ozônio. Além disso, a metade da concentração inibitória máxima do tratamento utilizado sobre as células viáveis (CI₅₀) foi de 1,71 µg/mL, confirmando o alto potencial leishmanicida desse composto.

O Índice de Seletividade (IS), que mede o quanto um composto é ativo contra o parasita sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos, é obtido dividindo-se o CC₅₀ pelo CI₅₀ e quanto maior esta razão, mais seletiva é a droga sobre o parasita e, conseqüentemente, menor efeito ela tem sobre a célula (PRAYONG; BARUSRUX; WEERAPREEYAKUL, 2008). Dividindo-se a CC₅₀ obtida (84,21 µg/mL) pela CI₅₀, o IS obtido foi de 49,25, o que mostra que o óleo ozonizado utilizado nesse estudo foi mais seletivo para o parasita do que para os macrófagos.

5.5 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do óleo ozonizado de girassol sobre formas amastigotas *in vitro*

Os parasitas de *Leishmania* são capazes de se replicar dentro dos macrófagos estimulando a célula a produzir citocinas e outras substâncias para a defesa do hospedeiro (KELLY et al., 2020). Nosso objetivo com esse experimento foi verificar se os tratamentos utilizados foram capazes de inibir a infecção dos macrófagos pelos parasitas de *L. amazonensis* e conseqüente replicação dos mesmos dentro dessas células. As porcentagens obtidas de

macrófagos contendo formas amastigotas em seu interior sobre o número total de macrófagos podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de macrófagos contendo amastigotas de *L. amazonensis* sobre o total de macrófagos peritoneais de camundongos, tratados *in vitro* com RPMI (controle negativo), Glucantime® (controle positivo), controle do óleo (CO) e concentrações de óleo de girassol ozonizado de 0,625 a 40 µg/mL, diluídos e meio RPMI e porcentagem de macrófagos infectados contendo 1, 2 3 ou mais parasitas. Valores em porcentagem (%).

	RPMI	Glu	CO	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40
Macrófagos contendo amastigotas (%)	58,4	18,2	36,4	56,3	33,8	36,4	18,8	6,7	4,8	0,0
1 parasita	33,7	9,1	36,4	37,5	30,9	29,5	18,8	6,7	4,8	0,0
2 parasitas	14,6	9,1	0,0	12,5	2,9	6,8	0,0	0,0	0,0	0,0
≥3 parasitas	10,1	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

No tratamento com o controle negativo (RPMI) quase 60% dos macrófagos continham estruturas parasitárias em seu interior, sendo que cerca de 10% dessas células possuíam 3 ou mais inclusões. Como esperado, esses números decaem quando as células são tratadas com o medicamento de referência, chegando a 0% de infecção por 3 ou mais parasitas.

Porém, uma diminuição mais pronunciada pode ser observada quando as células são tratadas com óleo ozonizado, sendo que na concentração de 10 µg/mL há menos do que a metade de amastigotas (6,7%) em comparação ao tratamento com Glucantime® (18,2%). Para a concentração de 40 µg/mL de óleo ozonizado não foram visualizados macrófagos infectados na lâmina, mostrando que essa concentração foi 100% eficaz na eliminação dos parasitas.

O tratamento com o controle do óleo mostra uma diminuição das amastigotas comparável à concentração de 2,5 µg/mL de óleo ozonizado, podendo ser referente, novamente à consistência oleosa do meio. Todavia, mais estudos não necessários para avaliar se o óleo em si impede a internalização dos parasitas ou é capaz de eliminar uma porcentagem dos mesmos após os macrófagos terem sido infectados. Além disso, a contagem do total de macrófagos divergiu entre os tratamentos, o que pode ter prejudicado a análise.

As imagens das células infectadas e não infectadas pelos parasitas, podem ser observadas na Figura 6.

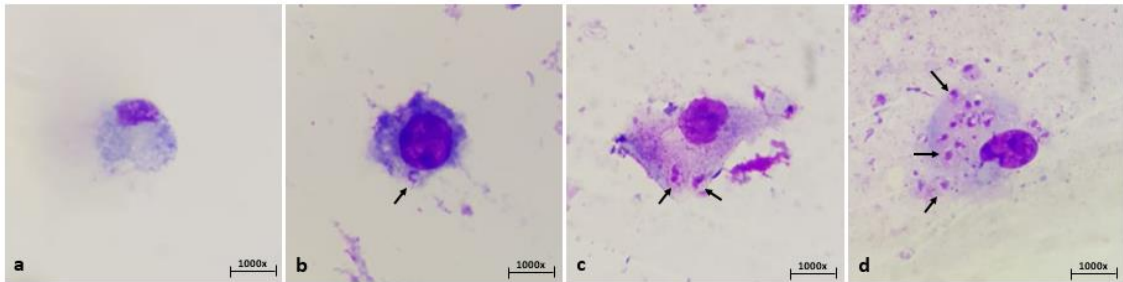
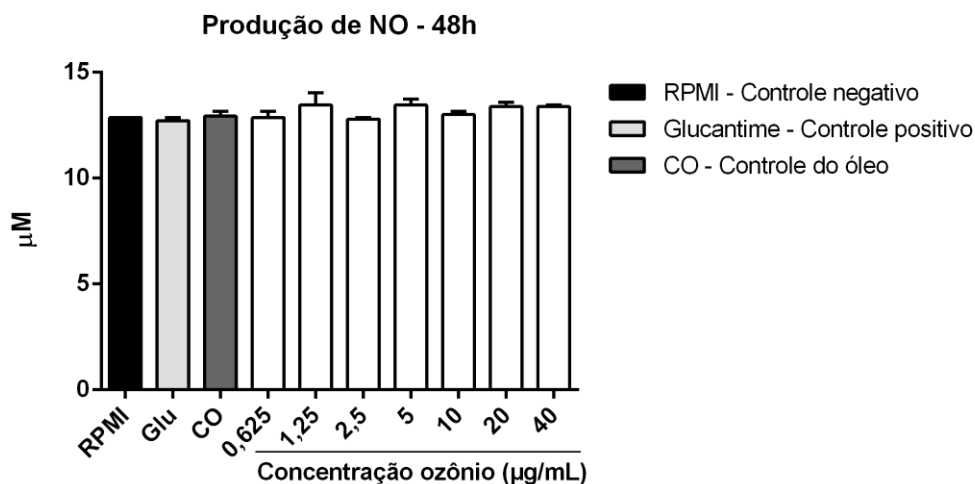


Figura 6. Macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à infecção *in vitro* por parasitas de *L. amazonensis* e tratados com RPMI, Glucantime®, óleo de girassol ozonizado e não ozonizado: (a) macrófago não infectado, (b) presença de um parasita, (c) presença de 2 parasitas e (d) presença de mais do que 3 parasitas intramacrófágicos, as inclusões parasitárias estão indicadas pelas setas.

5.6 Produção de NO por macrófagos contendo formas intracelulares de *L. amazonensis*

Após a infecção pelos parasitas os macrófagos produzem substâncias que auxiliam na eliminação dos microrganismos, a fim de impedir a evolução da doença. Entre esses compostos, o NO se destaca por promover a morte parasitária através da oxidação (REZA et al., 2019).

Nossos dados demonstram que os macrófagos produziram NO em todos os tratamentos, após 48 horas de exposição, entretanto, não houve diferença estatística entre eles (Figura 7).



Macrófagos infectados com *L. amazonensis* (amastigotas)

Figura 7. Efeito do tratamento com Glucantime®, óleo de girassol ozonizado e não ozonizado sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* após 48 horas de exposição ao tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes, em triplicata.

Isso indica que nenhuma das substâncias utilizadas nos tratamentos interferiu de forma relevante na produção de NO quando produzido por macrófagos infectados por *L. amazonensis*.

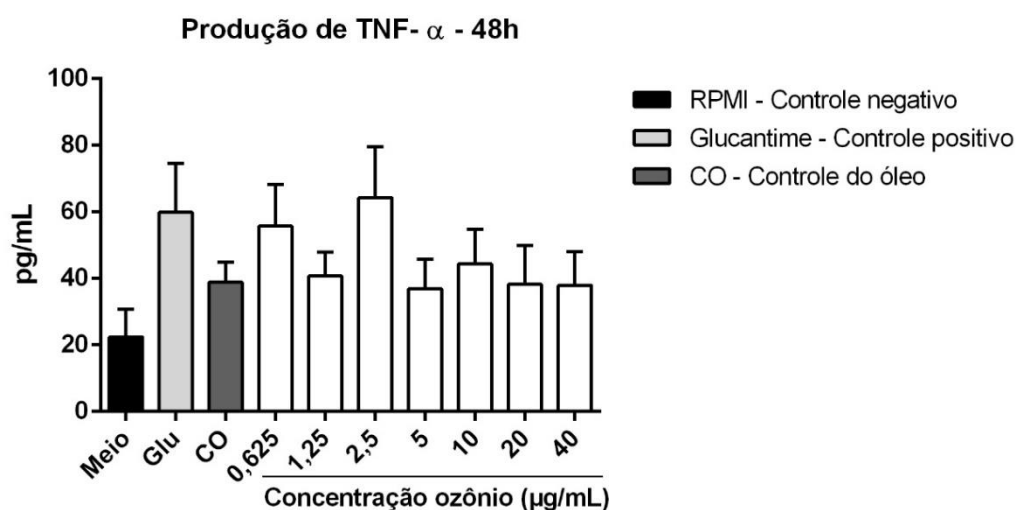
5.7 Produção de TNF- α por macrófagos contendo formas intracelulares de *L. amazonensis*

O TNF- α é uma citocina homodimérica, secretada principalmente pelos macrófagos ativados, células T, células NK e mastócitos (DAYAKAR et al., 2019). A atividade antiparasitária do TNF- α é mediada pela ativação de macrófagos infectados para a destruição de amastigotas intracelulares (MURRAY et al., 2000).

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa na produção de TNF- α pelos macrófagos infectados entre os tratamentos, em 48h de exposição (Figura 8). Segundo Gonzalez-Fajardo et al., (2015), a liberação de citocinas por células mononucleares infectadas com *Leishmania* apresenta pico de liberação de TNF- α com início após 12 horas de infecção,

portanto, há a possibilidade de que o auge de liberação dessa citocina possa ter ocorrido antes do tempo de dosagem (48 horas).

Pode-se observar ainda, que o Glucantime®, o controle do óleo e a concentração de 2,5 µg/mL de óleo ozonizado mostraram uma tendência à maior produção de TNF- α , sugerindo uma possível estimulação na liberação dessa citocina, apesar de não ser significativa em 48 horas. Todavia, mais estudos são necessários para avaliar esse potencial aumento.



Macrófagos infectados com *L. amazonensis* (amastigotas)

Figura 8. Efeito do tratamento com Glucantime®, óleo de girassol ozonizado e não ozonizado sobre a produção de TNF- α por macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* após 48 horas de exposição ao tratamento. Os valores apresentados são a média \pm SEM de três experimentos independentes, em triplicata.

5.8 Evolução das lesões

Sabe-se que as lesões oriundas da LC apresentam aspectos variados, dependendo de fatores como a quantidade de parasitas na área afetada. O tamanho e espessura das lesões está diretamente relacionado com esse número e, conseqüentemente, com o agravamento ou regressão da doença (BRASIL, 2007). Os resultados, em milímetros, da espessura das patas lesionadas dos camundongos tratados no procedimento experimental 1 e 2 podem ser observados na Figura 9.

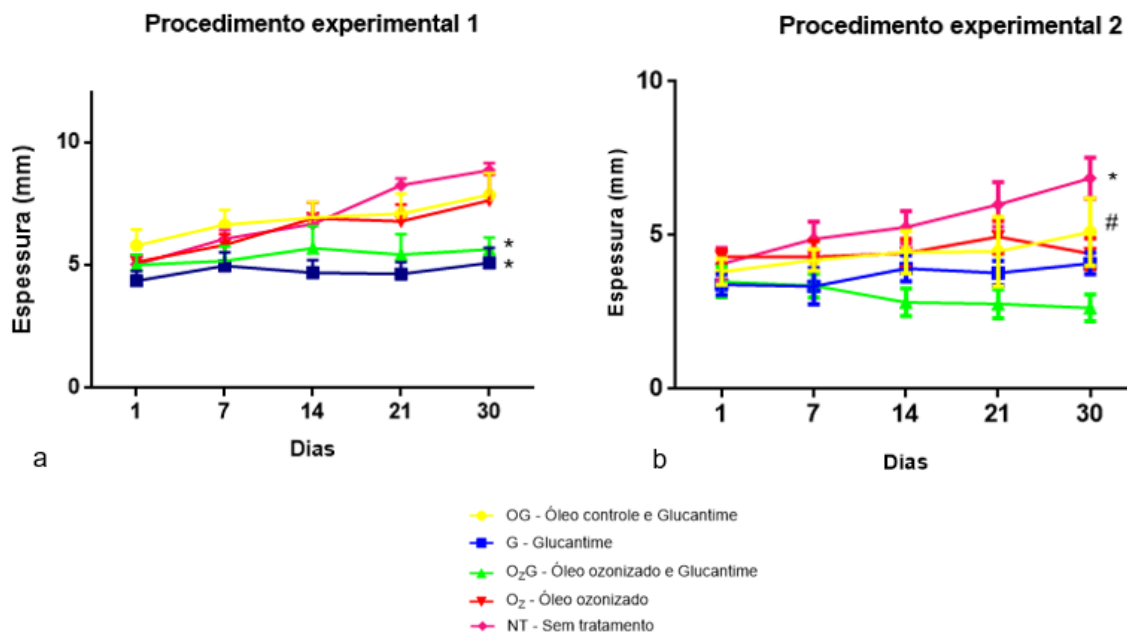


Figura 9. Espessura das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, em milímetros. Os valores apresentados são a média \pm SEM de quatro unidades experimentais por grupo. a) Procedimento experimental 1: ozonização do óleo por 30 minutos e 2 horas: significativamente diferente do controle não tratado (NT): * $p < 0,05$; b) Procedimento experimental 2: ozonização do óleo por 8 horas: significativamente diferente de G, O₂G e O₂: * $p < 0,05$; significativamente diferente de O₂G: # $p < 0,05$.

No procedimento 1, os únicos grupos que apresentaram diferença estatística significativa com o controle não tratado ao final do tratamento foram o grupo que recebeu somente Glucantime® e o que recebeu Glucantime® e óleo ozonizado. Observa-se ainda que esses grupos citados, conseguiram frear o aumento da pata desde o início do tratamento, mostrando uma porcentagem de crescimento do 1° ao 30° dia de 16 e 12%, respectivamente. Enquanto nos demais grupos o aumento foi de 35% para o que recebeu óleo não ozonizado e Glucantime®, 48% para o tratado somente com óleo ozonizado e 76% para o que não recebeu intervenção.

No início do tratamento o óleo foi ozonizado por 30 minutos à uma taxa de 0,5 L/min, porém no 14° dia esse óleo foi novamente ozonizado por 2 horas. No entanto, não foi possível explicar porque o grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado não mostrou resultados comparáveis ao tratado somente com o medicamento de referência, tomando por base o fato de que o óleo de girassol, mesmo sem ozônio, tem potencial para auxiliar na cicatrização, por

possuir uma grande concentração de ácidos graxos não saturados, principalmente o ácido linoleico, um composto importante para a cura de feridas (ALVES et al., 2019), portanto, são necessários mais estudos para elucidar essa questão.

Levando-se em consideração o trabalho de Oğuzkan et al., (2018), no qual foi observado que o óleo precisa ter um processo de ozonização mais longo para que possa ser eficaz na cicatrização de feridas (OĞUZKAN et al., 2018), ozonizamos o óleo de girassol por um período de 8 horas para a realização do procedimento experimental 2.

Somente o grupo tratado com óleo não ozonizado e Glucantime® não apresentou diferença significativa em comparação com o controle não tratado, apresentando uma porcentagem de aumento na espessura da pata de 33%, enquanto no grupo não tratado o aumento foi de 48%. Além disso, nesse experimento podemos observar uma diminuição significativa na espessura das patas do grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, com uma diminuição de 20% com relação ao início do tratamento, esse resultado é semelhante ao obtido por Cabral et al., (2020), em que as lesões tratadas com ozônio e Glucantime® mostraram redução de 15,2% ao final do tratamento (CABRAL et al., 2020). O grupo tratado com Glucantime® isolado e o grupo tratado somente com óleo ozonizado apresentaram um aumento na espessura de 10% e 7%, respectivamente.

Por meio desses resultados, podemos constatar que um maior tempo de ozonização do óleo e a terapia conjunta com Glucantime® é mais eficaz para contribuir com a diminuição da espessura da pata infectada por *L. amazonensis*. 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), portanto, a associação entre o Glucantime® e o óleo ozonizado pode levar à uma completa cicatrização em um período menor de tempo, proporcionando uma melhor qualidade de vida para os pacientes sob tratamento.

O tamanho e a forma das lesões antes de iniciar o tratamento devem ser levados em conta, visto que lesões maiores podem ser mais difíceis de controlar do que as menores e menos externalizadas. A evolução das lesões durante o

tratamento do procedimento experimental 1 e 2 podem ser observadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

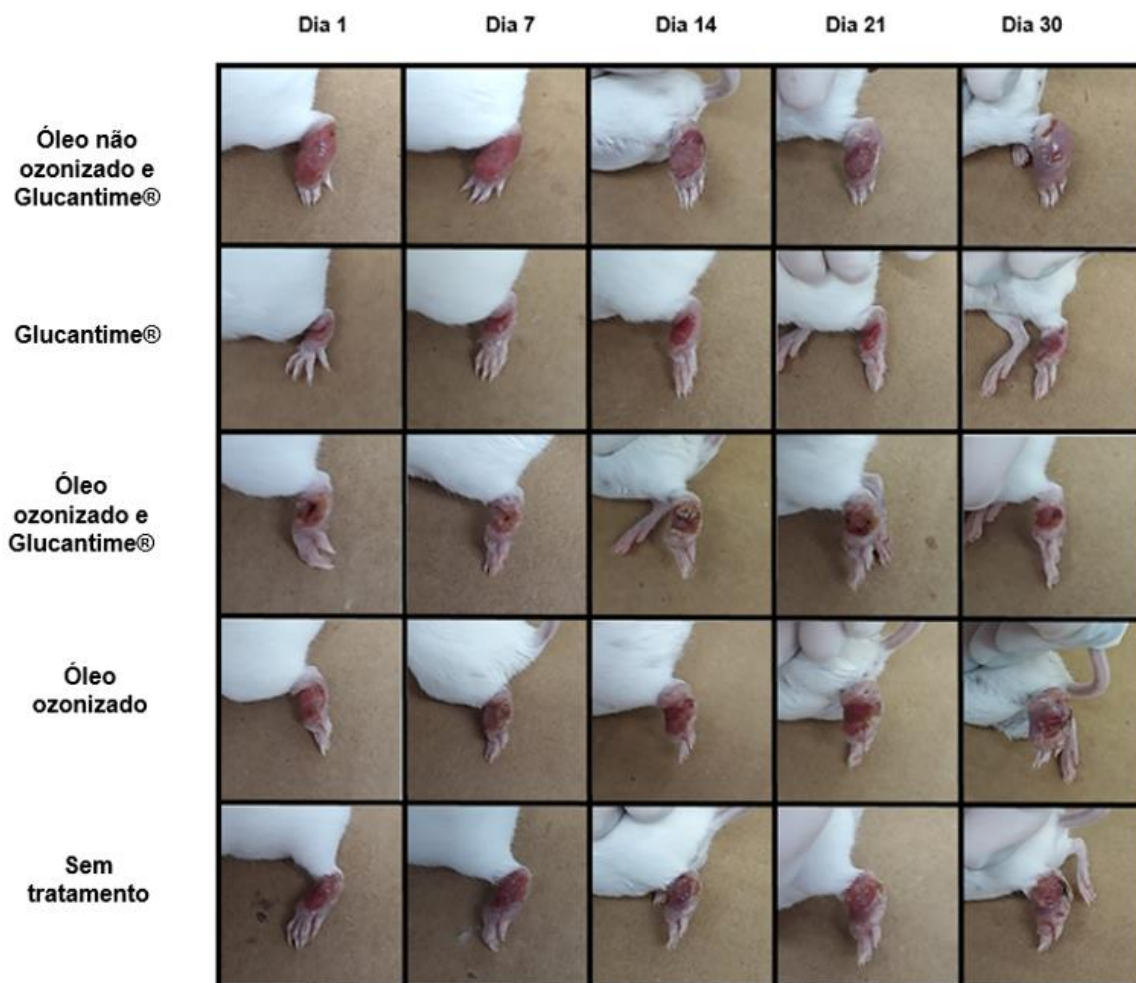


Figura 10. Evolução de lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos Balb/c ao longo de 30 dias – Procedimento experimental 1.

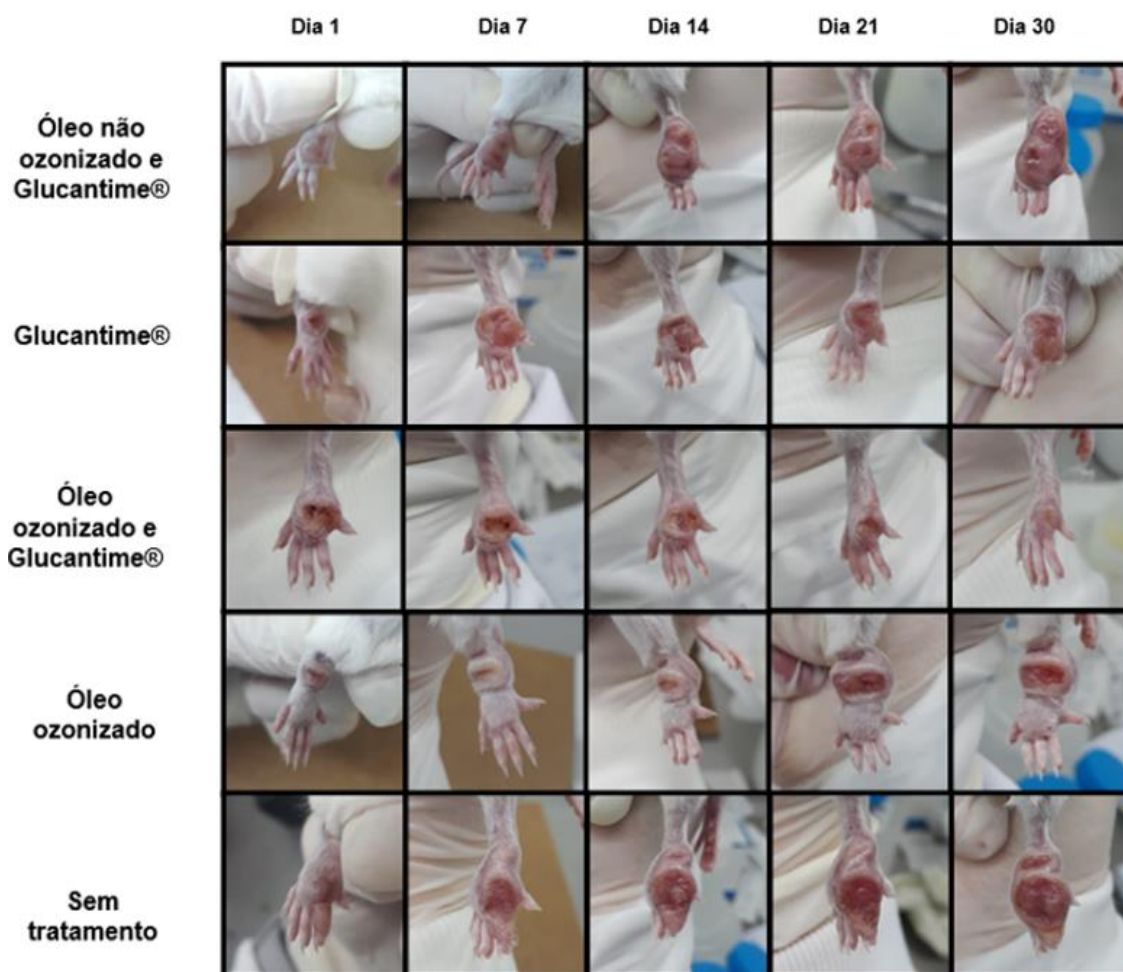


Figura 11. Evolução de lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos Balb/c ao longo de 30 dias – Procedimento experimental 2.

Com relação ao experimento 1, o grupo tratado com óleo não ozonizado e Glucantime® apresentava, no início do tratamento, uma lesão maior e mais externalizada em comparação com os demais, apresentando uma coloração mais avermelhada, como pode ser observado na Figura 10. Entretanto, esse grupo apresentou uma melhora no aspecto da ferida na última semana de tratamento, evidenciado pela formação de uma área de tecido que recobriu a região ruborizada quase totalmente. Porém, esse tratamento não foi eficaz na diminuição da espessura da pata, como observado nos resultados anteriores. Nos dois experimentos podemos observar que, ao final do tratamento, a lesão apresentava um aspecto mais úmido em comparação aos demais grupos, tal fato ser relacionado à aplicação do óleo de girassol sem ozônio, o que daria um aspecto emoliente à ferida. Todavia, no experimento 2 observa-se que esse

tratamento não foi eficaz na diminuição da espessura e na cicatrização da lesão, sendo comparável ao grupo não tratado.

O grupo que recebeu somente Glucantime® no experimento 1, teve um tamanho médio menor na espessura da pata no início do tratamento e esse tamanho foi praticamente mantido até o 30º dia, sugerindo o controle da infecção pelo medicamento. Nos últimos dias de tratamento houve formação de uma área endurecida, mostrando que a ferida apresentava uma boa evolução, mas, em contrapartida, a área lesionada aumentou em relação à primeira semana. Esses resultados podem ser observados também no experimento 2.

No experimento 1, o grupo que recebeu óleo ozonizado local associado ao Glucantime®, ao contrário do grupo tratado somente com o medicamento, apresentava uma espessura da pata lesionada maior no início dos cuidados, a qual teve seu tamanho relativamente conservado. Também se observou a formação de uma área que sugeria a cicatrização e houve diminuição da área lesionada. Já no experimento 2 a espessura da pata diminuiu consideravelmente e é possível observar a cicatrização quase completa da lesão, mostrando que essa associação entre o medicamento de referência e o óleo ozonizado, sendo este último ozonizado por 8 horas, teve o melhor resultado na cicatrização.

O grupo tratado somente com óleo ozonizado, nos 2 experimentos, não foi eficaz na cicatrização da lesão e, ademais, a espessura da pata aumentou. Porém, no experimento 2, esse aumento foi de apenas 7%, enquanto no primeiro foi de 48%, evidenciando, mais uma vez, que a ozonização por 8 horas foi mais eficaz para o tratamento.

Nos dois experimentos o grupo que não recebeu nenhum tipo de intervenção mostrou aumento progressivo do tamanho da lesão e espessura da pata, até mesmo com aparecimento de uma pequena área enegrecida, mostrando o início de uma necrose tecidual (no procedimento 1). Também no procedimento 1 observa-se que o aumento na espessura foi maior (76%), e isso se deve ao fato de que nesse experimento as lesões estavam maiores e em estágio mais avançado, no início dos tratamentos, do que no procedimento experimental 2, cujo aumento para o grupo sem tratamento foi de 48%.

5.9 Contagem de leucócitos

Com relação ao número de leucócitos, no procedimento 1 (Figura 12) houve diferença estatística significativa no início do tratamento entre o grupo tratado com óleo não ozonizado e Glucantime® e os demais grupos, com exceção daquele que recebeu somente o medicamento de referência. E este último apresentou diferença estatística em relação ao grupo que não recebeu tratamento. Essa diferença se deve, provavelmente, aos diferentes estágios de desenvolvimento da doença, como mostrado na evolução das lesões, onde o primeiro grupo apresentava lesões mais extensas.

Já no final do tratamento não houve diferença significativa entre nenhum grupo entre si, porém no grupo que recebeu Glucantime® e óleo ozonizado, no que recebeu somente óleo ozonizado e no que não recebeu intervenção as contagens de leucócitos foram maiores do que no início do tratamento.

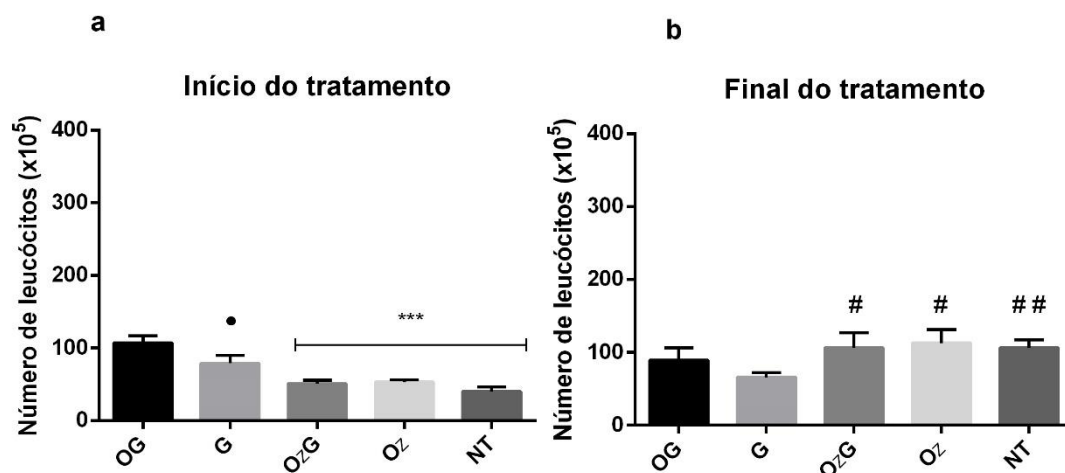


Figura 12. Número de leucócitos sanguíneos de camundongos infectados com *L. amazonensis* no início (a) e após trinta dias de tratamento (b). OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, G – grupo tratado com Glucantime®, OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, NT – grupo não tratado. Os valores apresentados são a média \pm SEM de quatro unidades experimentais por grupo. Significativamente diferente do controle (NT): • $p < 0,05$. Significativamente diferente de OG: *** $p < 0,001$. Significativamente diferente entre os grupos no início e final do tratamento: # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$.

No procedimento experimental 2 (Figura 13), no início do tratamento, não houve diferença estatística significativa entre nenhum dos grupos, mostrando que o processo inflamatório se encontrava em estágio muito próximo de

evolução. Após 30 dias, o único grupo que apresentou diferença com relação ao não tratado, foi o grupo tratado somente com óleo ozonizado, mostrando um possível efeito anti-inflamatório do ozônio. Com relação ao grupo que recebeu Glucantime® e óleo ozonizado, já que o Glucantime® possui um efeito pró-inflamatório (SANTOS et al., 2019), a utilização concomitante com o óleo ozonizado, pode ter levado a um equilíbrio na produção das células brancas.

Esse resultado é comparável ao obtido por Cabral et al., (2020), onde foi demonstrada a influência do ozônio, mesmo aplicado localmente, no número de leucócitos, modulando-os com atividade anti-inflamatória (CABRAL et al., 2020).

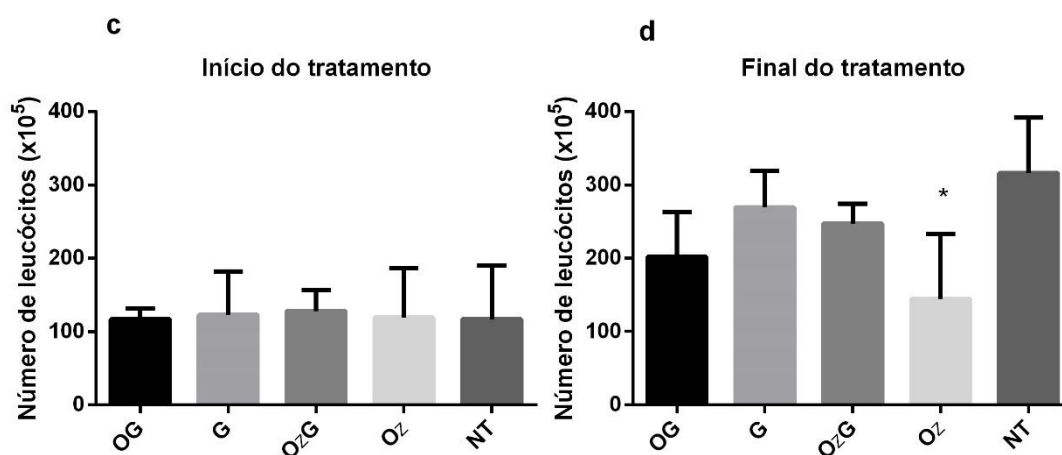


Figura 13. Número de leucócitos sanguíneos de camundongos infectados com *L. amazonensis* no início (c) e após trinta dias de tratamento (d). OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, G – grupo tratado com Glucantime®, OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, NT – grupo não tratado. Os valores apresentados são a média ± SEM de quatro unidades experimentais por grupo. Significativamente diferente do controle não tratado (NT): * p<0,05.

5.10 Esfregaço da borda da lesão (Imprint) da pata lesionada – Carga parasitária I

Por meio do esfregaço da borda da lesão na LC é possível observar células parasitadas com amastigotas de *L. amazonensis*, além de formas promastigotas. Com relação ao experimento 1, o grupo que foi tratado somente com óleo ozonizado mostrou um valor de LDU menor do que os demais grupos. Como a contagem de LDU avalia as formas amastigotas presentes em células

externas do tecido lesionado, esse resultado sugere que o O₃ age na superfície da lesão atuando como leishmanicida local (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidade de parasitas presentes na borda da lesão em Unidades Leishman-Donovan (LDU) – Procedimento experimental 1.

Grupos	Unidades Leishman-Donovan (LDU)
Óleo controle + Glucantime (OG)	1657
Glucantime (G)	1241
Óleo ozonizado + Glucantime (OzG)	1122
Óleo ozonizado (Oz)	747
Não tratado (NT)	4110

Depois desse grupo, o que recebeu óleo ozonizado e Glucantime® e o que recebeu somente Glucantime® foram os que apresentaram uma contagem menor de LDU. O grupo OG, mesmo com a utilização do Glucantime®, não mostrou resultados satisfatórios com relação ao número de amastigotas comparando-o aos que utilizaram o óleo ozonizado, portanto apesar do óleo por si só ser conhecido pelo efeito benéfico na cicatrização (ALVES et al., 2019), ele parece não ter efeito sobre os parasitas.

No experimento 2, para o grupo que recebeu conjuntamente o óleo ozonizado e o medicamento de referência, não foram visualizadas nas lâminas estruturas parasitárias, tanto amastigotas quanto promastigotas, constatando assim a eficácia desse tratamento. O grupo tratado somente com Glucantime® foi o segundo com melhores resultados, seguido pelo que recebeu somente óleo ozonizado e pelo que recebeu Glucantime® e óleo não ozonizado.

Tabela 4. Quantidade de parasitas presentes na borda da lesão em Unidades Leishman-Donovan (LDU) - Procedimento experimental 2.

Grupos	Unidades Leishman-Donovan (LDU)
Óleo controle + Glucantime (OG)	1841
Glucantime (G)	800
Óleo ozonizado + Glucantime (OzG)	0
Óleo ozonizado (Oz)	1483
Não tratado (NT)	4427

As imagens dos esfregaços das bordas das lesões de cada grupo, nos experimentos 1 e 2, podem ser visualizadas nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

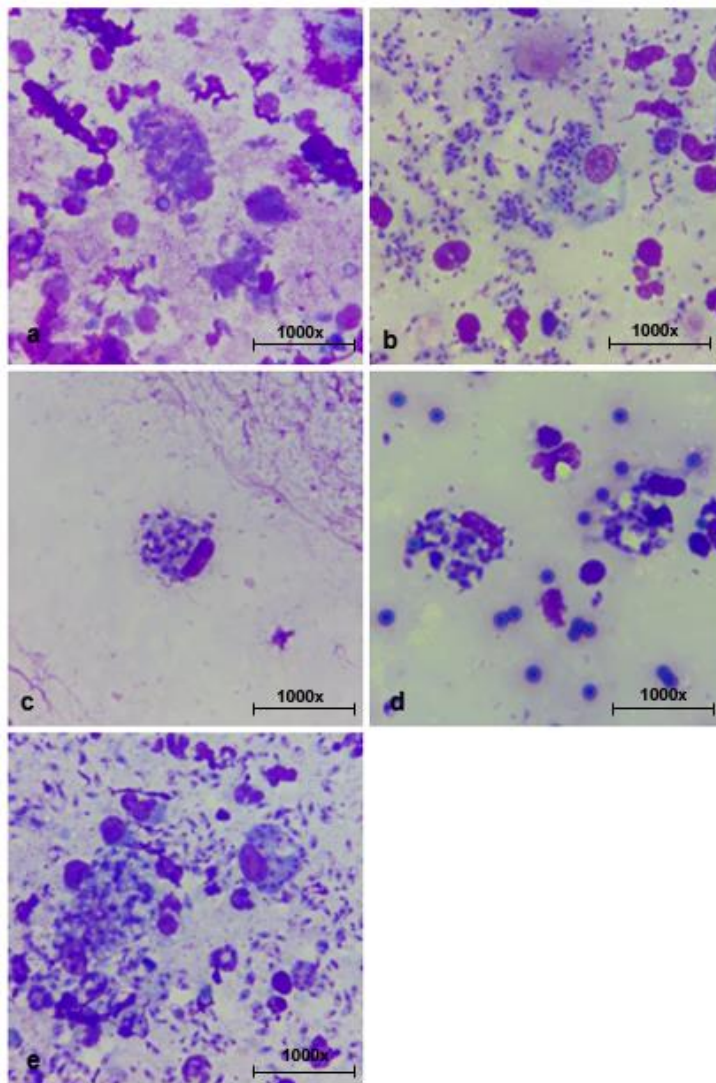


Figura 14. Esfregaço da borda das lesões causadas por *L. amazonensis* na pata de camundongos, corados por Giemsa (imprint), leitura feita em microscópio convencional no aumento de 1000x: (a) OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, (b) G – grupo tratado com Glucantime®, (c) OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, (d) Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, (e) NT – grupo não tratado. - Procedimento experimental 1.

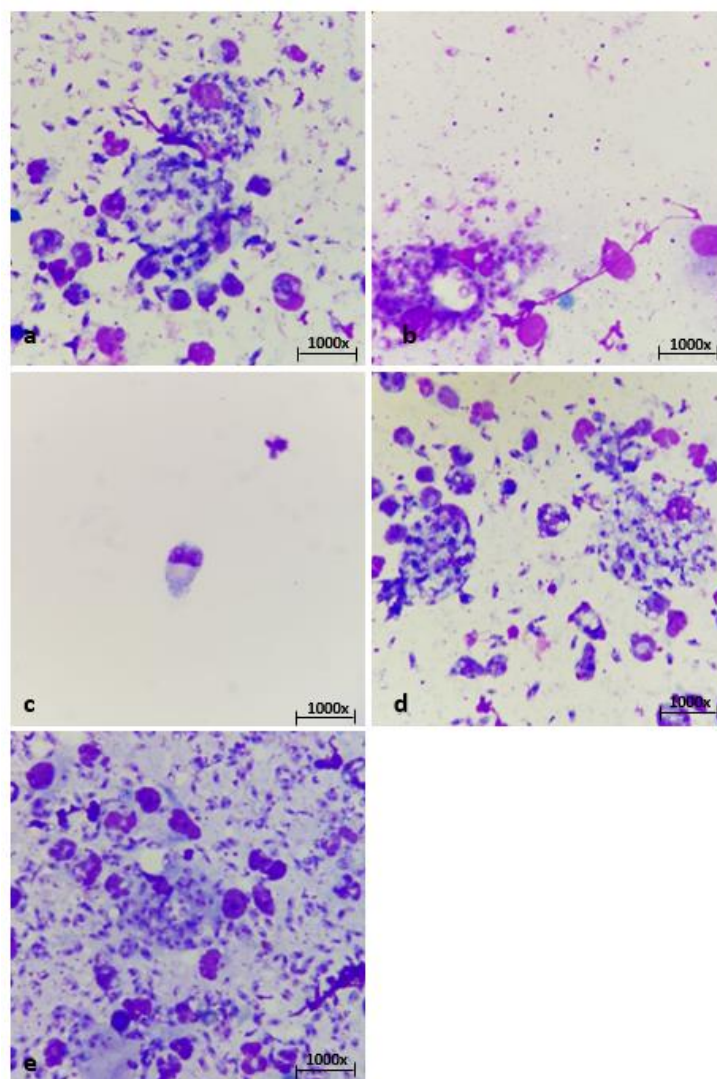


Figura 15. Esfregaço da borda das lesões causadas por *L. amazonensis* na pata de camundongos, corados por Giemsa (imprint), leitura feita em microscópio convencional no aumento de 1000x: (a) OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, (b) G – grupo tratado com Glucantime®, (c) OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, (d) Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, (e) NT – grupo não tratado - Procedimento experimental 2.

Pelas imagens podemos verificar que no experimento 1, o grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, o grupo tratado somente com Glucantime® e o grupo que recebeu Glucantime® e óleo ozonizado, apresentaram maior quantidade de parasitas do que no experimento 2. Já no grupo que recebeu somente óleo ozonizado, esse resultado foi inverso, mostrando mais parasitas no segundo experimento. Como observado nos experimentos de evolução da lesão (Figuras 10 e 11), esse grupo não obteve eficácia na cicatrização. Portanto, apesar do ozônio ser considerado um potente leishmanicida local, podemos concluir que a associação do mesmo com o

medicamento de referência é a maneira mais eficiente de eliminar os parasitas e promover a cura da lesão. Constatamos isso por meio do experimento 2, em que o valor de LDU obtido para a terapia associada (grupo O₂G) foi de 0.

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

O cultivo de formas promastigotas após o tratamento da lesão é eficaz para evidenciar a influência dessa intervenção na diminuição de parasitas viáveis, já que, teoricamente, um número menor de células se multiplica menos no decorrer do tempo.

Para a realização da cultura, no experimento 1, foi extraído um fragmento que envolveu a parte interna da ferida, como consequência houve um aumento no número de parasitas. No primeiro dia portanto, houve crescimento no maior título em todos os 5 grupos, no último, porém, o grupo que foi tratado com Glucantime® isolado mostrou uma melhora nesse aspecto, com uma média de títulos de 1/96, corroborando a hipótese de que o Glucantime® age de dentro para fora, enquanto o O₃ tópico atua no exterior da ferida, ocasionando assim uma sinergia entre os dois no avanço do tratamento (Tabela 5).

Tabela 5. Diluição da cultura de fragmentos das patas infectadas com *L. amazonensis* em meio 199. Os valores apresentados são a média dos títulos de quatro unidades experimentais por grupo – Procedimento experimental 1.

Grupos	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 30
Glucantime® e óleo não ozonizado (OG)	1/384	1/384	1/384	1/312	1/240
Glucantime® (G)	1/384	1/384	1/288	1/216	1/96
Glucantime® e óleo ozonizado (O₂G)	1/384	1/384	1/384	1/320	1/192
Óleo ozonizado (O_z)	1/384	1/384	1/384	1/336	1/120
Não tratado (NT)	1/384	1/384	1/384	1/384	1/384

Devido ao crescimento em todos os títulos, todos os poços foram contados em câmara de Neubauer. Esses resultados podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6. Contagem de promastigotas da cultura de patas lesionadas de camundongos infectados com *L. amazonensis*, diluição 1:2, resultados em número de células x10⁵. OG - tratado com óleo não ozonizado e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, O₂G - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, O₂ - tratado com óleo ozonizado e NT - não tratado. *Animal excluído dos testes no procedimento experimental 1.

DIA 1				
OG	G	O ₂ G	O ₂	NT
1	2	4	3	14
1	2	0	2	15
2	3	2	1	11
1	2	0	1	14
DIA 7				
OG	G	O ₂ G	O ₂	NT
3	13	9	94	42
36	4	5	64	106
50	9	3	35	166
53	9	3	34	139
DIA 14				
OG	G	O ₂ G	O ₂	NT
3	85	133	992	60
232	4	102	376	576
212	3	59	488	784
348	8	36	192	640
DIA 21				
OG	G	O ₂ G	O ₂	NT
48	92	1024*	632	150
384	4	108	28	1856
432	8	8	144	1648
160	2	12	1	450
DIA 30				
OG	G	O ₂ G	O ₂	NT
9	85	384	21	112
5	4	51	14	382
14	3	28	20	275
27	8	64	25	179

Título:

1/384
1/192
1/96
1/48

No experimento 2, para o grupo que recebeu tratamento adjunto de Glucantime® e óleo ozonizado, não houve crescimento de parasitas em nenhum título, e o grupo tratado somente com óleo ozonizado, apresentou uma média no 30º dia de 1/12. Para esse procedimento, o fragmento foi coletado de forma a evitar pegar partes internas da lesão, com isso é possível analisar melhor a infecção na superfície lesionada, todos os fragmentos foram pesados para fim de padronização. Esses resultados evidenciam, como já mostrado anteriormente, o potencial leishmanicida local do óleo ozonizado e a eficácia da associação entre o O₃ e o Glucantime (Tabela 7).

Tabela 7. Diluição da cultura de fragmentos das patas infectadas com *L. amazonensis* em meio 199. Os valores apresentados são a média dos títulos de quatro unidades experimentais por grupo – Procedimento experimental 2.

Grupos	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 30
Glucantime® e óleo não ozonizado (OG)	1/5	1/6	1/8	1/8	1/24
Glucantime® (G)	1/3	1/5	1/5	1/6	1/16
Glucantime® e óleo ozonizado (O₂G)	0	0	0	0	0
Óleo ozonizado (O_z)	1/3	1/3	1/9	1/9	1/12
Não tratado (NT)	1/336	1/384	1/384	1/384	1/384

5.12 Análise Histológica

Como os resultados obtidos no procedimento experimental 2 foram mais assertivos no tratamento dos animais, a histologia das lesões foi feita somente com os grupos utilizados nesse procedimento. Nas análises dos achados histológicos as alterações histopatológicas variaram de acordo com o tratamento. O grupo tratado com óleo não ozonizado e Glucantime®, o grupo que só recebeu óleo ozonizado e o grupo que não recebeu tratamento, apresentaram uma hiperplasia pseudoepiteliomatosa, ou seja, uma descontinuidade do epitélio periférico devido às ulcerações, apresentando uma riqueza de parasitas. Já o grupo que recebeu apenas Glucantime® e o que recebeu os dois tratamentos em conjunto, apresentaram uma melhor

manutenção do epitélio, sendo bastante pronunciada neste último grupo, como pode ser observado na Figura 16.

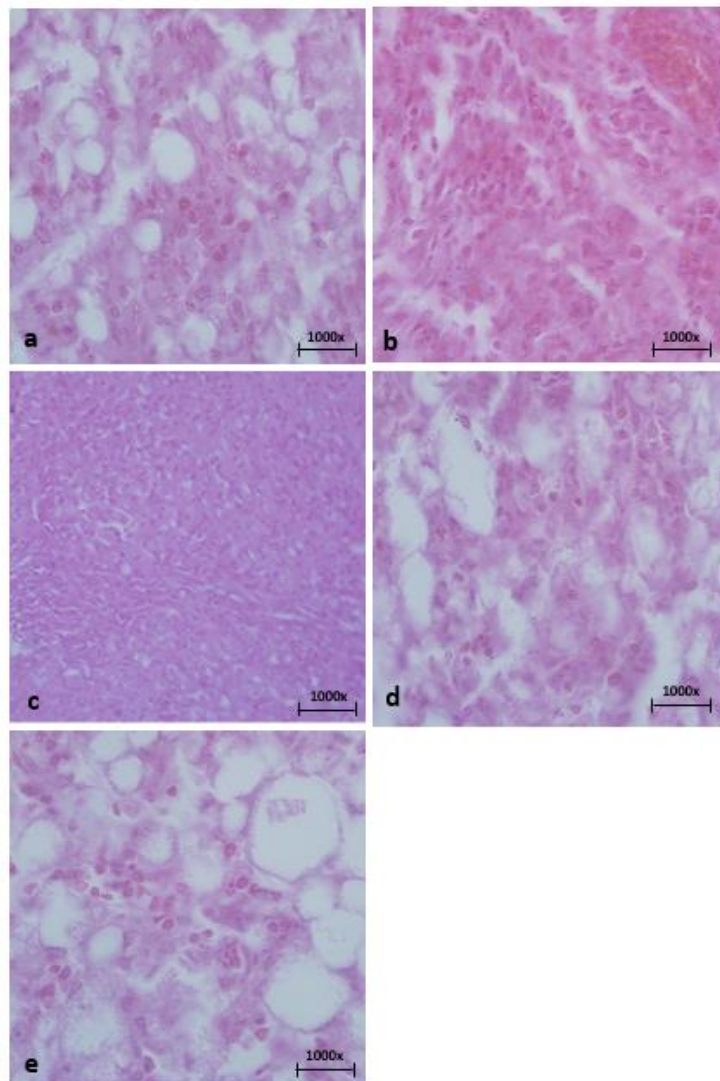


Figura 16. Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E, no aumento de 1000x: (a) OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, (b) G - tratado com Glucantime®, (c) O₂G - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, (d) Oz - tratado com óleo ozonizado e (e) NT – não tratado - Procedimento experimental 2

Todos os grupos que receberam Glucantime® mostraram um tamanho de epiderme semelhantes entre si, e o grupo que recebeu terapia conjunta de Glucantime® e óleo ozonizado apresentou ainda um espessamento da camada granulosa, indicado pelas setas (Figura 17). O grupo que recebeu somente óleo ozonizado local mostrou um tamanho menor da epiderme, apresentando diferença estatística significativa com os 3 grupos citados anteriormente e, por

fim, o grupo que não recebeu intervenção apresentou uma camada muito fina de epiderme restante, apresentando diferença estatística significativa a todos os demais grupos, mostrando que a infecção consumiu grande parte do extrato córneo e da camada lúcida do tecido. Estes resultados podem ser observados nas Figuras 17 e 18.

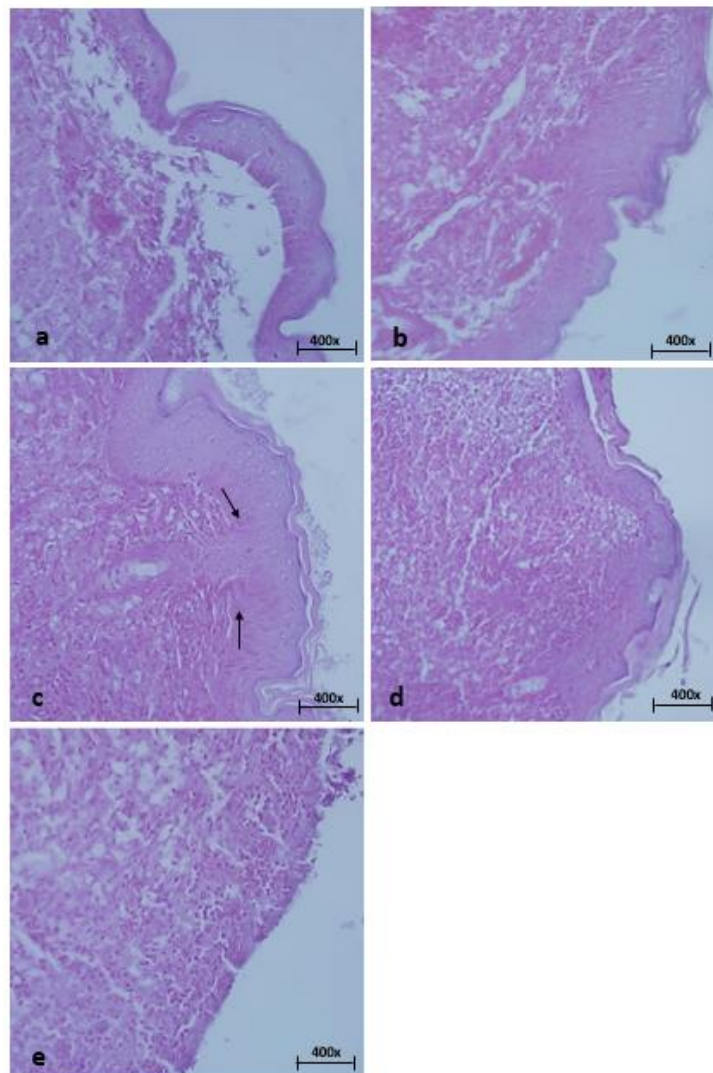


Figura 17. Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E, no aumento de 400x: (a) OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, (b) G - tratado com Glucantime®, (c) OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime® (setas indicando aumento da camada granulosa), (d) Oz - tratado com óleo ozonizado e (e) NT – não tratado - Procedimento experimental 2

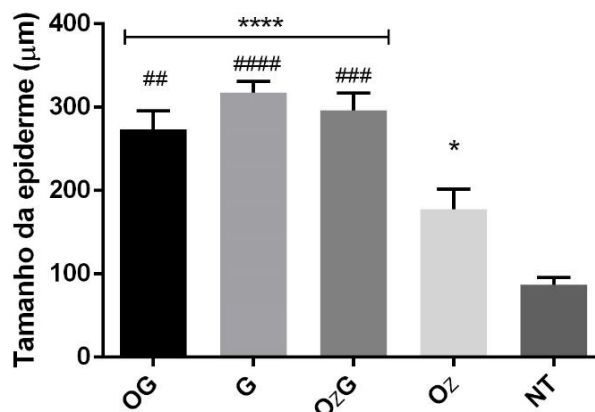


Figura 18. Espessura da epiderme da pata infectada com *L. amazonensis* de animais infectados e tratados. OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, G – grupo tratado com Glucantime®, O₂G – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, O₂ – grupo tratado com óleo ozonizado, NT – grupo não tratado. Significativamente diferente do controle não tratado (NT): * p<0,05, **** p<0,0001. Significativamente diferente de O₂: ## p<0,01, ### p<0,001, #### p<0,0001. – Procedimento experimental 2.

Na contagem de leucócitos, realizada por meio das fotomicrografias no aumento de 1000x (Figura 19), o grupo não tratado apresentou uma contagem de células superior aos demais, sendo estatisticamente diferente das contagens dos grupos tratados com óleo ozonizado e não ozonizado em conjunto com Glucantime® (OG e O₂G). E, como observado nas imagens da Figura 17, o grupo que recebeu óleo ozonizado isolado e o sem tratamento mostraram uma grande quantidade de parasitas e de leucócitos no tecido, indicando que a reação inflamatória continuava intensa no final do tratamento. O grupo tratado com óleo não ozonizado e Glucantime®, apesar de apresentar grande quantidade de parasitas e ulcerações no tecido, não apresentou uma reação inflamatória tão elevada quando comparado aos demais grupos, com exceção do tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, apresentando menos células imunes na região. Estudos mais aprofundados são necessários para investigar o porquê dessa ocorrência.

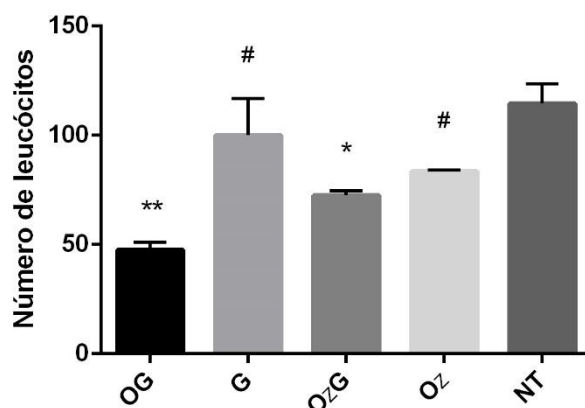


Figura 19. Contagem de leucócitos de lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos. OG – grupo tratado com Glucantime® e óleo não ozonizado, G – grupo tratado com Glucantime®, OzG – grupo tratado com Glucantime® e óleo ozonizado, Oz – grupo tratado com óleo ozonizado, NT – grupo não tratado. Significativamente diferente do controle não tratado (NT): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Significativamente diferente de OG: # $p < 0,05$ – Procedimento experimental 2.

5.13 Dosagem de óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais e por células totais de linfonodos de camundongos submetidos ao tratamento com óleo ozonizado de girassol

Para avaliar o efeito sistêmico da infecção e dos diferentes tratamentos, os macrófagos peritoneais dos animais foram retirados ao final do protocolo e colocados em cultura, sendo mantidos somente em meio, ou adicionou-se LPS a este meio. Dosou-se então o nível de NO no sobrenadante dessa cultura. No experimento 1, após 24 horas de incubação, não houve diferença significativa na produção de NO entre os grupos quando incubados somente com o meio RPMI ou entre os mesmos tratados com o LPS. Porém, quando comparados dentro do próprio grupo, no tratado com Glucantime® (G) houve maior produção de NO quando estimulado pelo LPS em comparação com o meio de cultura.

Já em 48 horas, houve menor produção de NO pelos macrófagos dos grupos de animais tratados em relação ao grupo não tratado, quando incubados com meio de cultura. Porém, o tratamento com LPS aumentou a produção de NO pelas células, eliminando a diferença estatística. Com relação à comparação

intragrupo, novamente o grupo G mostrou diferença entre a células estimuladas com LPS e não estimuladas (Figura 20).

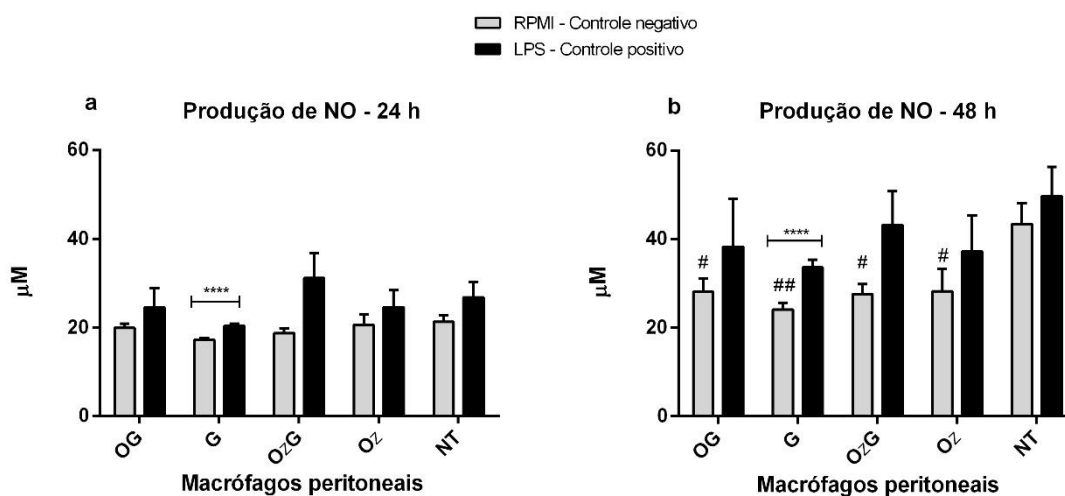


Figura 20. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante dos macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 24 h de tratamento (a) e após 48 h de tratamento (b). OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - sem tratamento. Significativamente diferente do controle não tratado (NT) - RPMI: # p<0,05 e ## p<0,01. Significativamente diferente dentro do grupo: *** p<0,001 e **** p<0,0001 – Procedimento experimental 1.

No experimento 2, em 24 horas, somente houve diferença quando comparada a produção de NO pelos macrófagos do grupo G, tratados ou não, com LPS. No entanto, não observou-se diferença na produção de NO por parte de nenhum outro grupo, estimulados com LPS ou não.

Em 48 horas de exposição, o grupo tratado com óleo ozonizado e Glucantime® e o tratado somente com óleo ozonizado aumentaram a produção de NO de forma significativa, mostrando diferença para o grupo não tratado, quando incubados com meio e quando estimulados por LPS. O grupo G manteve a diferença intragrupo observada em 24h (Figura 21).

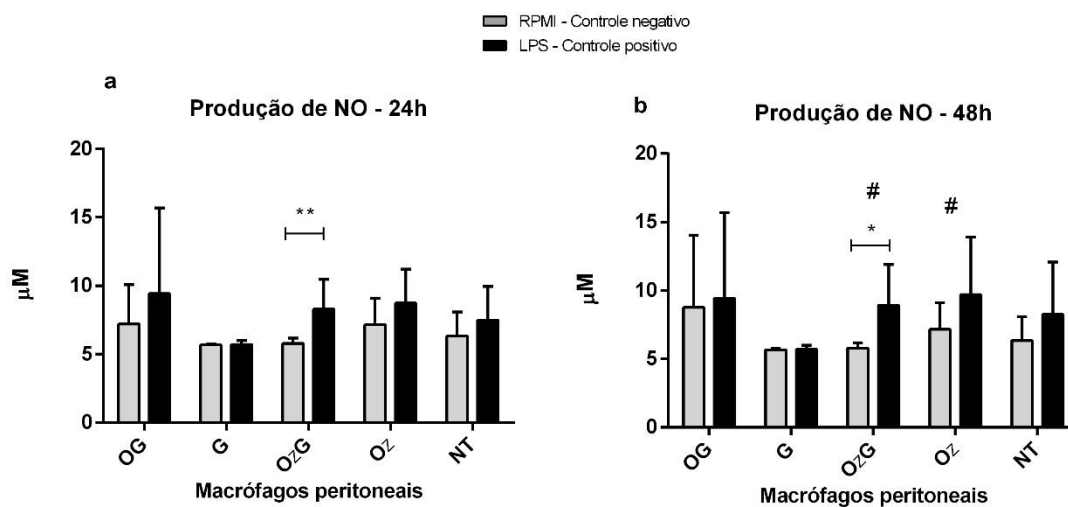


Figura 21. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante dos macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 24 h de tratamento (a) e após 48 h de tratamento (b). OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - sem tratamento. Significativamente diferente do controle não tratado (NT) - RPMI e LPS: # p<0,05. Significativamente diferente dentro do grupo: * p<0,05, ** p<0,01 – Procedimento experimental 2.

Com o intuito de verificar as mudanças no sistema imune localmente, os linfonodos drenantes dos animais infectados foram retirados e tiveram suas células plaqueadas, além disso, metade dessas células receberam antígenos de *L. amazonensis* e a outra metade não. A produção de NO por essas células foi verificada e no experimento 1, com relação aos grupos não estimulados, houve maior produção de NO pelo grupo tratado somente com óleo ozonizado em relação aos demais grupos, não ocorrendo, porém, diferença significativa para o grupo tratado com óleo ozonizado e Glucantime®. Quanto ao tratamento com ASL, o grupo não tratado produziu mais NO em comparação com os demais, exceto com o que recebeu óleo ozonizado isolado. Este grupo (Oz) produziu significativamente mais NO do que o que recebeu o óleo não ozonizado e Glucantime® (OG). Não houve diferença na produção de NO entre o controle negativo e o ASL dentro dos grupos (Figura 22).

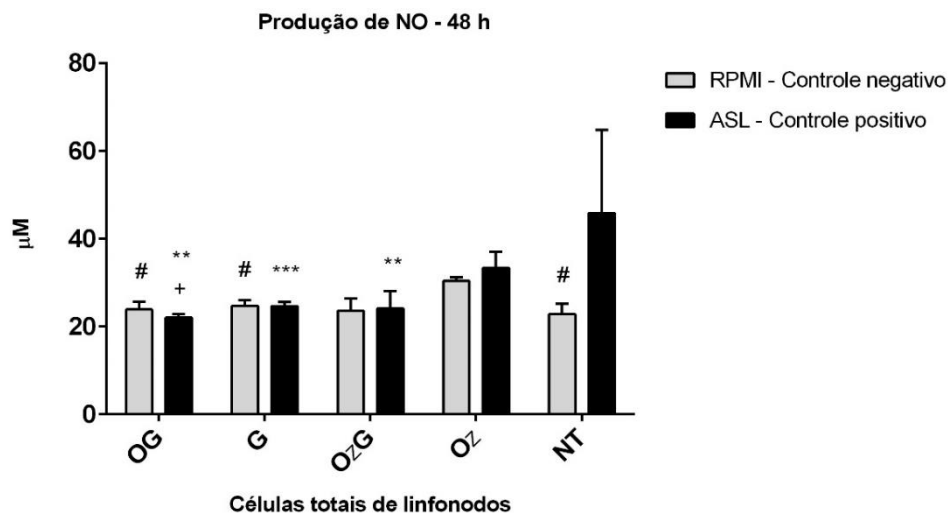


Figura 22. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante de linfonodos poplíteos de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 48 h de tratamento. OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - sem tratamento. Significativamente diferente de Oz-RPMI: # $p < 0,05$. Significativamente diferente do controle não tratado (NT) – ASL: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Significativamente diferente de Oz - ASL: + $p < 0,05$. - Procedimento experimental 1.

No experimento 2, houve diferença estatística na produção de NO quando comparados o grupo de células não-estimuladas, sendo que o grupo que recebeu somente Glucantime®, mostrou uma produção significativamente maior que os grupos de terapia conjunta de óleo ozonizado e Glucantime® (OzG) e o não tratado (NT). Intragrupo, apenas o que recebeu óleo ozonizado isolado mostrou diferença quando estimulado pelo ASL em relação às suas células não-estimuladas.

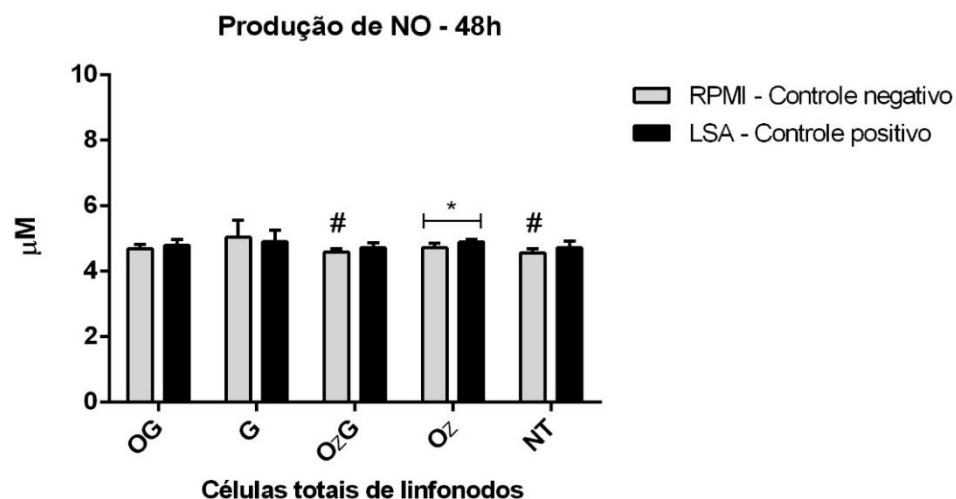


Figura 23. Dosagem de óxido nítrico a partir do sobrenadante de linfonodos poplíteos de camundongos infectados com *L. amazonensis* após 48 h de tratamento. OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT - sem tratamento. Significativamente diferente de G - RPMI: # $p < 0,05$. Significativamente diferente intragrupo: * $p < 0,05$ - Procedimento experimental 2

Em resumo, em comparação com o controle não tratado, a maioria dos grupos apresentou diferença na produção de NO, geralmente produzindo menos essa substância, tanto nos grupos que receberam somente RPMI, quanto nos que foram estimulados com LPS ou ASL. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a influência do ozônio e dos demais tratamentos na modulação da produção desse composto.

5.14 Dosagem de citocinas

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). Além disso, a IL-4 inibe a explosão oxidativa induzindo a produção de baixos níveis de intermediários reativos de oxigênio e NO em macrófagos (DAYAKAR et al., 2019; WILFLINGSEDER et al., 2005; WOELBING et al., 2006).

Com relação à produção de IL-4 pelas células totais de linfonodos poplíteos dos camundongos, no procedimento experimental 2, todos os tratamentos produziram uma quantidade menor dessa citocina quando comparados com o controle não tratado, tanto os que receberam somente RPMI quanto os que receberam ASL (Figura 25a).

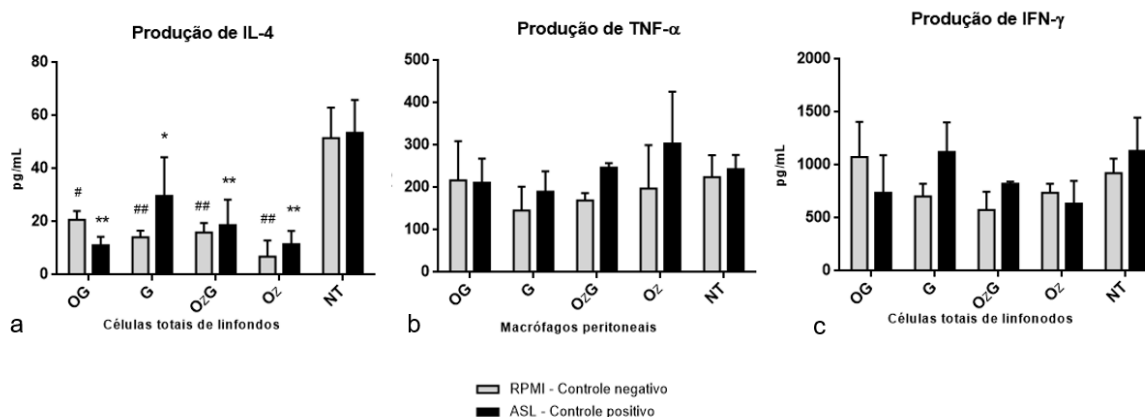


Figura 25. Dosagem de citocinas, por ELISA, a partir do sobrenadante de linfonodos poplíteos e macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis*. a) Produção de IL-4; b) Produção de TNF – α ; c) Produção de IFN – γ . Grupos: OG - tratado com óleo controle e Glucantime®, G - tratado com Glucantime®, OzG - tratado com óleo ozonizado e Glucantime®, Oz - tratado com óleo ozonizado e NT – não tratado. Significativamente diferente do grupo não tratado (NT) – RPMI: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$. Significativamente diferente do grupo não tratado (NT) - ASL: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ - Procedimento experimental 2.

O papel protetor do TNF- α na infecção por *Leishmania* é caracterizado pela ativação dos macrófagos, produção de NO e eliminação do parasita ou supressão da propagação do mesmo para outras células (WILHELM et al., 2001), além de promover o controle do número de parasitas na pele, nódulos linfáticos e no baço e atuar benéficamente no processo de cicatrização de feridas (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Os macrófagos peritoneais dos animais infectados com *L. amazonensis* no experimento 2 produziram uma grande quantidade de TNF- α de forma a tentar eliminar os parasitas, isso se deve ao processo inflamatório sistêmico que contribui para o aumento na produção e consequente elevação desses índices nessas células. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos, não foi possível, portanto, relacionar os tratamentos utilizados ao aumento ou diminuição na produção dessa citocina (Figura 25b).

O IFN- γ é uma glicoproteína homodimérica que consiste em duas subunidades com cerca de 21 a 24 kDa (DAYAKAR et al., 2019). Das várias

citocinas anti-*Leishmania*, o IFN- γ é a citocina mais significativa na proteção do hospedeiro, desempenhando um papel predominante na ativação de macrófagos para produzir moléculas leishmanicidas (MOSSER; EDWARDS, 2008).

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).

Nossos resultados não mostraram diferença estatística significativa na produção de IFN- γ entre os grupos de animais infectados e tratados (Figura 25c), embora houvesse produção dessa citocina em níveis elevados. 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 (MAHMOOD, 2018).

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.

6. CONCLUSÕES

Em suma, o óleo ozonizado se manteve estável durante o tratamento dos animais, não apresentando citotoxicidade celular *in vitro* sobre macrófagos de camundongos, além de ser mais seletivo para o parasita do que para as células. E, além disso, o O₃ foi eficaz na eliminação tanto de promastigotas, quanto amastigotas de *L. amazonensis in vitro*.

Nos experimentos *in vivo* houve diferenças importantes entre os procedimentos experimentais 1 e 2, em que este último foi mais eficaz devido ao maior tempo de ozonização do óleo de girassol. E ainda, foi observado um

possível efeito anti-inflamatório do O₃ na produção de leucócitos e NO. Houve também diminuição da carga parasitária em cultura e em esfregaço superficial quando os camundongos foram tratados com Glucantime® e óleo ozonizado, além da manutenção razoável do epitélio celular na análise histológica. Ademais, essa terapia conjunta contribuiu para a diminuição na espessura da pata infectada e melhorou a cicatrização. Constatou-se também a alta produção de TNF- α e IFN- γ e menor produção, em comparação com o grupo não tratado, de IL-4 pelas células dos camundongos.

Em resumo, a terapia adjunta de óleo ozonizado de girassol e o medicamento Glucantime® foi eficaz na eliminação dos parasitas de *L. amazonensis*, tanto *in vitro* como *in vivo*, promovendo a cura das lesões cutâneas causadas pela leishmaniose. 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.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2019.

AGHAEI, Maryam; AGHAEI, Shahrzad; SOKHANVARI, Fatemeh; ANSARI, Nazli; HOSSEINI, Sayed Mohsen; MOHAGHEGH, Mohammad Ali; HEJAZI, Seyed Hossein. The therapeutic effect of ozonated olive oil plus glucantime on human cutaneous leishmaniasis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 25–30, 2019. DOI: 10.22038/ijbms.2018.29232.7064.

ALVES, Anselmo Queiroz; DA SILVA, Valdemiro Amaro; GOÉS, Alexandre José Silva; SILVA, Mariza Severina; DE OLIVEIRA, Gibson Gomes; BASTOS, Isla Vanessa Gomes Alves; DE CASTRO NETO, Antonio Gomes; ALVES, Antonio José. The fatty acid composition of vegetable oils and their potential use in wound care. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 32, n. 8, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1097/01.ASW.0000557832.86268.64.

AMOROSO, Michelle; ROSSOL, Manuela; HEINE, Holger; MEUSCH, Undine; QUANDT, Dagmar; KLEIN, Carina; SWEET, Matthew J.; HAUSCHILDT, Sunna. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379–446, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22142165>.

ANVERSA, Laís.; TIBURCIO, Monique Gomes Salles; RICHINI-PEREIRA, Virginia Bodelão; RAMIREZ, Luis Eduardo. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018. DOI: 10.1590/1806-9282.64.03.281.

ARONSON, Naomi E.; JOYA, Christie A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 101–117, 2019. DOI: 10.1016/j.idc.2018.10.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>.

BRASIL. Ministério da Saúde, **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 702, de 18 de março de 2018. Brasília, 2018.

BEN-NERIAH, Yinon; KARIN, Michael. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 715–723, 2011. DOI:

10.1038/ni.2060.

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.

BORGES, Gabriel Álvares; ELIAS, Silvia Taveira; DA SILVA, Sandra Márcia Mazutti; MAGALHÃES, Pérola Oliveira; MACEDO, Sergio Bruzadelli; RIBEIRO, Ana Paula Dias; GUERRA, Eliete Neves Silva. *In vitro* evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 3, p. 364–370, 2017. DOI: 10.1016/j.jcms.2017.01.005.

CABRAL, Isaac Loreiro; UTZIG, Samuel Luiz; BANHUK, Fernanda Weyand; STAFEEN, Izabela Virginia; LOTH, Eduardo Alexandre; DE AMORIM, João Paulo Arruda; NEGRETTI, Fabio; GANDRA, Rinaldo Ferreira; AYALA, Thaís Soprani; MENOLLI, Rafael Andrade. Aqueous ozone therapy improves the standard treatment of leishmaniasis lesions in animals leading to local and systemic alterations. **Parasitology Research**, v. 119, n. 12, p. 4243–4253, 2020. DOI: 10.1007/s00436-020-06925-8.

CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 2019. DOI: 10.1080/14656566.2019.1609940. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>.

CHOUHAN, Garima; ISLAMUDDIN, Mohammad; WANT, Muzamil Y.; ABDIN, Malik Z.; OZBAK, Hani A.; HEMEG, Hassan A.; SAHAL, Dinkar; AFRIN, Farhat. Apoptosis mediated leishmanicidal activity of *Azadirachta indica* bioactive fractions is accompanied by Th1 immunostimulatory potential and therapeutic cure in vivo. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–24, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0788-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0788-3>.

CIRLINI, M.; CALIGIANI, A.; PALLA, G.; DE ASCENTIIS, A.; TORTINI, P. Stability Studies of Ozonized Sunflower Oil and Enriched Cosmetics with a

Dedicated Peroxide Value Determination. **Ozone: Science and Engineering**, v. 34, n. 4, p. 293–299, 2012. DOI: 10.1080/01919512.2012.692992.

DA SILVA, Suse Botelho; DE MELLO LUVIELMO, Márcia; GEYER, Mariana Curtinovi; PRÁ, Ivana. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 32, n. 2, p. 659–682, 2011. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32n2p659.

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.

DAZA GONZÁLEZ, Maria Angeles.; MIRÓ, Guadalupe.; FERMÍN RODRÍGUEZ, M.; RUPÉREZ NOGUER, C.; FRAGÍO ARNOLD, C. Short term impacts of meglumine antimoniate treatment on kidney function in dogs with clinical leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 126, n. August, p. 131–138, 2019. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.08.026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.026>.

ENGELS, Dirk; ZHOU, Xiao Nong. Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1186/s40249-020-0630-9.

FORMAN, Henry Jay; TORRES, Martine. Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 12 II, 2002. DOI: 10.1164/rccm.2206007.

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>.

GLANS, Hedvig; DOTEVALL, Leif; SÖBIRK, Sara Karlsson; FÄRNERT, Anna; BRADLEY, Maria. Cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis in Sweden from 1996–2016: a retrospective study of clinical characteristics, treatments and outcomes. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 632, 2018. DOI: 10.1186/s12879-018-3539-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3539-1>.

GONZALEZ-FAJARDO, Laura; FERNÁNDEZ, Olga Lucía; MCMAHON-PRATT, Diane; SARAVALIA, Nancy Gore. *Ex Vivo* Host and Parasite Response to Antileishmanial Drugs and Immunomodulators. **Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–20, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003820.

GREEN, Laura C.; WAGNER, David A.; GLOGOWSKI, Joseph; SKIPPER, Paul L.; WISHNOK, John S.; TANNENBAUM, Steven R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.

GUPTA, Subash C.; SUNDARAM, Chitra; REUTER, Simone; AGGARWAL, Bharat B. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 10–12, p. 775–787, 2010. DOI: 10.1016/j.bbagr.2010.05.004.

HAMILL, Louise Claire; HASLAM, Dominic; ABRAHAMSSON, Sofia; HILL, Becks; DIXON, Ruth; BURGESS, Heather; JENSEN, Kimberly; D'SOUZA, Susan; SCHMIDT, Elena; DOWNS, Philip. People are neglected, not diseases: the relationship between disability and neglected tropical diseases. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1093/trstmh/trz036. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/advancearticle/doi/10.1093/trstmh/trz036/5492713>.

HAMLET ACEVEDO OSPINA E ALBERT DESCOTEAUX. *Leishmania donovani* modulates host macrophage mitochondrial metabolism, integrity, and function. **The journal of immunology**, v. 204, 2020.

JOSE SILVA, De Paula; JABACE, Júnia; MAIA, Soares. Doenças negligenciadas em Minas Gerais e determinantes sociais. **Revista Atenas Higéia**, v. 1, p. 1–6, 2017. Disponível em: <http://www.atenas.edu.br/revista/index.php/higeia/article/view/6/8>.

JUBAN, Gaëtan; CHAZAUD, Bénédicte. Metabolic regulation of macrophages during tissue repair: insights from skeletal muscle regeneration. **FEBS Letters**,

v. 591, n. 19, p. 3007–3021, 2017. DOI: 10.1002/1873-3468.12703.

KAMHAWI, Shaden; SERAFIM, Tiago D. *Leishmania*: A Maestro in Epigenetic Manipulation of Macrophage Inflammasomes. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 498–501, 2020. DOI: 10.1016/j.pt.2020.04.008.

KELLY, Felice D.; TRAN, Khoa D.; HATFIELD, Jess; SCHMIDT, Kat; SANCHEZ, Marco A.; LANDFEAR, Scott M. A cytoskeletal protein complex is essential for division of intracellular amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 13106–13122, 2020. DOI: 10.1074/jbc.ra120.014065. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.014065>.

KIM, Hee Su; NOH, Sun Up; HAN, Ye Won; KIM, Kyoung Moon; KANG, Hoon; KIM, Hyung Ok; PARK, Young Min. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. **Journal of Korean Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 368–374, 2009. DOI: 10.3346/jkms.2009.24.3.368.

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.

LEE, Kun Yeong. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. **Medical Biological Science and Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2019. DOI: 10.30579/mbse.2019.2.1.1.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **American Journal of Pathology**, v. 78, n. 1, p. 71–99, 1975.

LEÓN FERNÁNDEZ, Olga Sonia; VIEBAHN-HAENSLER, Renate; CABREJA, Gilberto López; ESPINOSA, Irainis Serrano; MATOS, Yanet Hernández; ROCHE, Liván Delgado; SANTOS, Beatriz Tamargo; ORU, Gabriel Takon; POLO VEGA, Juan Carlos. Medical ozone increases methotrexate clinical response and improves cellular redox balance in patients with rheumatoid arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 789, p. 313–318, 2016. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.07.031. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.031>.

LIU, J.; ZHANG, P.; J, Tian; LI, J.; TIAN, JH; YANG, K. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes (Review) summay of findings for the main comparison. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, p. CDO11979, 2017. DOI: 10.1002/14651858.CD008474.pub2.www.cochranelibrary.com.

LU, J.; CHEN, M.; GAO, L.; CHENG, Q.; XIANG, Y.; HUANG, J.; WU, K.; HUANG, J.; LI, M. A preliminary study on topical ozonated oil in the therapeutic management of atopic dermatitis in murine. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 29, n. 7, p. 676–681, 2018. DOI: 10.1080/09546634.2018.1443199.

MA, Qiang; WU, Yin Sheng; SHEN, Jiang Yong; YANG, Zhi Bin; SHEN, Hong Xia; YAO, Miao; YU, Chun Hua. Walnut oil promotes healing of wounds and skin defects in rats via regulating the NF-kB pathway. **Pharmazie**, v. 73, n. 12, p. 721–724, 2018. DOI: 10.1691/ph.2018.8605.

MARCHESINI, Bruna Fuhr; RIBEIRO, Silene Bazi. Efeito da ozonioterapia na cicatrização de feridas. **Fisioterapia Brasil**, v. 21, n. 3. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.33233/fb.v21i3.2931>. v. 21, n. 3, p. 281–288, 2020.

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.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio; RAMOS JÚNIOR, Alberto Novaes; HEUKELBACH, Jorge. Mortalidade relacionada às doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 2000-2011: magnitude, padrões espaço-temporais e fatores associados. **Revista de Medicina da UFC**, v. 56, n. 1, p. 79, 2016. DOI: 10.20513/2447-6595.2016v56n1p79-80.

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>

MINUTTI, Carlos M.; KNIPPER, Johanna A.; ALLEN, Judith E.; ZAISS, Dietmar M. W. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 61, p. 3–11, 2017. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.08.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2016.08.006>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008. DOI: 10.1038/nri2448. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2448>.

MOUREU, Sophie; VIOLLEAU, Frédéric; ALI HAIMOUD-LEKHAL, Djamila; CALMON, Anne. Influence of Storage Temperature on the Composition and the Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil. **Ozone: Science and Engineering**, v. 38, n. 2, p. 143–149, 2016. DOI: 10.1080/01919512.2015.1128319. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2015.1128319>.

MÜLLER, Karl Erik; SOLBERG, Carl Tollef; AOKI, Juliana Ide; FLOETER-WINTER, Lucile Maria; NERLAND, Audun Helge. Developing a vaccine for leishmaniasis: How biology shapes policy. **Tidsskrift for den Norske Lægeforening**, v. 138, n. 3, 2018. DOI: 10.4045/tidsskr.17.0620.

MURRAY, H. W.; JUNGBLUTH, A.; RITTER, E.; MONTELIBANO, C.; MARINO, M. W. Visceral Leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6289–6293, 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.11.6289-6293.2000.

NA, Jungtae; LEE, Kwanghyun; NA, Wonho; SHIN, Jee Yoon; LEE, Min Jung; YUNE, Tae Young; LEE, Hae Kwang; JUNG, Han Sung; KIM, Won Sun; JU, Bong Gun. Histone H3K27 Demethylase JMJD3 in Cooperation with NF- κ B Regulates Keratinocyte Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 4, p. 847–858, 2016. DOI: 10.1016/j.jid.2015.11.029.

OĞUZKAN, Sibel Bayil; KAYA, Salih Tunç; CESUR, Aziz; KARAGÜL, Bora; UĞRAŞ, Serpil; UĞRAŞ, Halil Ibrahim. Determination of Effect on Cutaneous Wound Healing of Ozonated Hazelnut Oil. **Proceedings**, v. 2, n. 25, p. 1537, 2018. DOI: 10.3390/proceedings2251537.

ONG, Yih Ching; ROY, Saonli; ANDREWS, Philip C.; GASSER, Gilles. Metal Compounds against Neglected Tropical Diseases. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 2, p. 730–796, 2019. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00338.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis. Epidemiological Report of the Americas 2018**. WHO, 2018. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34856>

PAOLONI, Marco; DI SANTE, Luca; CACCHIO, Angelo; APUZZO, Dario; MAROTTA, Salvatore; RAZZANO, Michele; FRANZINI, Marianno; SANTILLI, Valter. Intramuscular oxygen-ozone therapy in the treatment of acute back pain with lumbar disc herniation: A multicenter, randomized, double-blind, clinical trial of active and simulated lumbar paravertebral injection. **Spine**, v. 34, n. 13, p. 1337–1344, 2009. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181a3c18d.

PIVOTTO, Ana Paula.; BANHUK, Fernanda Weyand; STAFFEN, Izabela Virginia; DAGA, Maiara Aline; AYALA, Thaís Soprani.; MENOLLI, Rafael Andrade. Clinical uses and molecular aspects of ozone therapy: A review. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 1, 2020. DOI: 10.3844/ojbsci.2020.37.49.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7–8, p. 598–601, 2008. DOI: 10.1016/j.fitote.2008.06.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2008.06.007>.

RAJABI, Omid; SAZGARNIA, Ameneh; ABBASI, Fatemeh; LAYEGH, Pouran. The activity of ozonated olive oil against *Leishmania major* promastigotes. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 9, p. 915–919, 2015.

REZA, Shafiei; HASAN, Namdar Ahmadabad; MARYAM, Nezafat Firizi; FAHIMEH, Bakhshi Joibari; GHAHREMANI, Amirali; GHOLAMREZA, Hatam; AMIN, Ghatee Mohammad. Cytokine profile and nitric oxide levels in macrophages exposed to *Leishmania infantum* FML. **Experimental Parasitology**, v. 203, n. April, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.05.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.05.004>.

RINGELMANN, R.; HEYM, Beate. *Leishmania donovani*. **Parasiten des Menschen**, p. 168–169, 1991. DOI: 10.1007/978-3-642-85397-5_55.

RISUEÑO, J.; ORTUÑO, M.; PÉREZ-CUTILLAS, P.; GOVENA, E.; MAIA, C.; CORTES, S.; CAMPINO, L.; BERNAL, L. J.; MUÑOZ, C.; ARCENILLAS, I.; MARTÍNEZ-RONDÁN, F. J.; GONZÁLVEZ, M.; COLLANTES, F.; ORTIZ, J.; MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; BERRIATUA, E.. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 259, p. 61–67, 2018. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.05.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.012>.

ROBERT MCMASTER, W.; MORRISON, Charlotte J.; KOBOR, Michael S. Epigenetics: A New Model for Intracellular Parasite-Host Cell Regulation. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 515–521, 2016. DOI: 10.1016/j.pt.2016.04.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.002>.

RODERO, Mathieu P.; KHOSROTEHRANI, Kiarash. Skin wound healing modulation by macrophages. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 3, n. 7, p. 643–653, 2010.

SAGAI, Masaru; BOCCI, Velio. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress?. **Medical Gas Research**, v. 1, n. 1, 2011. DOI: 10.1186/2045-9912-1-29.

SAHASRABUDHE, Shreya N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, Veronica; O'MEARA, Meghan; FARKAS, Brian E. Density, viscosity, and surface tension of five vegetable oils at elevated temperatures: Measurement and modeling. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 2, p. 1965–1981, 2017. DOI: 10.1080/10942912.2017.1360905. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1360905>.

SANTOS, Marcos Ferreira; GRAÇA, Alexandre Pires; PEREIRA, Maria A.; MARQUES, Cátia S.; GOMES, Joana; CORREIA, Jorge; DUARTE, Ana; GOMES, Lídia; RODRIGUES, Armanda V.; BASSO, Alexandra; REISINHO, Ana; MEIRELES, José; SANTOS, Mateus David; BRITO, Maria Teresa Villa; TAVARES, Luís; GOMES, Gabriela M. Santos; DA FONSECA, Isabel Pereira. Meglumine antimoniate and miltefosine combined with allopurinol sustain pro-inflammatory immune environments during canine leishmaniasis treatment. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. October, 2019. DOI: 10.3389/fvets.2019.00362.

SEVERO, Patrícia.. Ozonioterapia: Suas Diversas Aplicações Clínicas E Perspectivas Para O Tratamento Da Úlcera Venosa. **Anais do Seminário Tecnologias Aplicadas a Educação e Saúde**, v. 1, n. 1, p. 215–225, 2020.

SKALSKA, Kinga; LEDAKOWICZ, Stanisław; PERKOWSKI, Jan; SENCIO, Barbara. Germicidal properties of ozonated sunflower oil. **Ozone: Science and Engineering**, v. 31, n. 3, p. 232–237, 2009. DOI: 10.1080/01919510902838669.

SMITH, Noel; WILSON, Anthony; GANDHI, Jason; VATSIA, Sohrab; KHAN, Sardar. Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, v. 7, n. 3, p. 212-219, 2017. DOI:

10.4103/2045-9912.215752.

SNYDER, Robert J.; LANTIS, John; KIRSNER, Robert S.; SHAH, Vivek; MOLYNEAUX, Michael; CARTER, Marissa J. Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 4, p. 613–629, 2016. DOI: 10.1111/wrr.12444.

SOARES, Ciro D.; MORAIS, Thayná M. L.; ARAÚJO, Roberta M. F. G.; MEYER, Patrícia F.; OLIVEIRA, Eric A. F.; SILVA, Rodrigo M. V.; CARREIRO, Eneida M.; CARREIRO, Edvaldo P.; BELLOCO, Verônica G.; MARIZ, Bruno A. L. A.; JACKS, Jorge Junior. Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats. **Growth Factors**, v. 37, n. 1–2, p. 95–103, 2019. DOI: 10.1080/08977194.2019.1643339.

STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2028-5.

THOMA, Anastasia; LIGHTFOOT, Adam P. Nf-kb and inflammatory cytokine signalling: Role in skeletal muscle atrophy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1088, p. 267–279, 2018. DOI: 10.1007/978-981-13-1435-3_12.

TRIPATHI, Parul; SINGH, Vinod; NAIK, Sita. Immune response to *Leishmania*: Paradox rather than paradigm. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00311.x.

VALACCHI, G.; FORTINO, V.; BOCCI, V. The dual action of ozone on the skin. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 6, p. 1096–1100, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2005.06939.x.

VAN DER AUWERA, Gert; DUJARDINA, Jean Claude. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 265–294, 2015. DOI: 10.1128/CMR.00104-14.

VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79–99, 2019. DOI: 10.1016/j.idc.2018.10.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>.

VAZ, Michelle Rossana Ferreira; DE FRANÇA, Ricardo Luiz Soares; DE ANDRADE, Sirtys Santos Lessa; DE SOUSA JUNIOR, Francisco Canindé; DOS

SANTOS, Everaldo Silvino; MARTINS, Daniella Regina Arantes; DE MACEDO, Gorete Ribeiro. Influence of culture medium on the production of EIF antigen from *Leishmania chagasi* in recombinant *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1390–1396, 2011. DOI: 10.1590/S1517-83822011000400021.

VITRAL, Julia Cristina de Andrade. Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 8, n. 3, p. 359–365, 2008. DOI: 10.4034/1519.0501.2008.0083.0018.

WANG, Xiaoqi. Emerging roles of ozone in skin diseases. **Journal of Central South University (Medical Sciences)**, v. 43, n. 2, p. 114–123, 2018. a. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.002.

WANG, Xiaoqi. Emerging roles of ozone in skin diseases. **Journal of Central South University (Medical Sciences)**, v. 43, n. 2, p. 114–123, 2018. b. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.002.

WILFLINGSEDER, Doris; BANKI, Zoltan; DIERICH, Manfred P.; STOIBER, Heribert. Mechanisms promoting dendritic cell-mediated transmission of HIV. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 2, p. 229–237, 2005. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.06.019.

WILHELM, Patricia; RITTER, Uwe; LABBOW, Stefanie; DONHAUSER, Norbert; RÖLLINGHOFF, Martin; BOGDAN, Christian; KÖRNER, Heinrich. Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant C57BL/6 Mice Lacking TNF. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 4012–4019, 2001. DOI: 10.4049/jimmunol.166.6.4012.

WOELBING, Florian et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 1, p. 177–188, 2006. DOI: 10.1084/jem.20052288.

YUNIATI, R.; SUBCHAN, P.; RIAWAN, W.; KHRISNA, M. B.; RESTIWIJAYA, M.; DYAN, N. S.; NUR, M. Topical ozonated virgin coconut oil improves diabetic ulcer wound healing in diabetic mice model. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1524, n. 1, 2020. DOI: 10.1088/1742-6596/1524/1/012127.

YUSSOF, Shah Jumaat Mohd; OMAR, Effat; PAI, Dinker R.; SOOD, Suneet.

Cellular events and biomarkers of wound healing. **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 45, n. 2, p. 220–228, 2012. DOI: 10.4103/0970-0358.101282.

ZANARDI, I.; BURGASSI, S.; PACCAGNINI, E.; GENTILE, M.; BOCCI, V.; TRAVAGLI, V. What is the best strategy for enhancing the effects of topically applied ozonated oils in cutaneous infections? **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/702949.

ZARGARAN, Mahdis; FATAHINIA, Mahnaz; ZAREI MAHMOUDABADI, Ali. The efficacy of gaseous ozone against different forms of *Candida albicans*. **Current Medical Mycology**, v. 3, n. 2, p. 26–32, 2017. DOI: 10.29252/cmm.3.2.26.

8. ANEXOS

ANEXO I



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 Sagae Schneider
 Vice Coordenadora do CEUA

ANEXO II

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.

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.

➤ **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.