



Reparação do retalho axial dorsal em ratos tratados com óleo ozonizado

[*Repair of the axial dorsal skin flap in rats treated with ozonized oil*]

"Artigo Científico/Scientific Article"

Aline Medeiros Nakamura , Marcelo Carrijo da Costa , Jorge Luis Álvarez Gómez , Felipe Noleto de Paiva* , Andriago Barboza De Nardi 

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Jaboticabal (UNESP), Jaboticabal-SP, Brasil.

*Autor para correspondência/Corresponding author: E-mail: n-paiva@hotmail.com

Resumo

O retalho de padrão axial representa uma importante opção na cirurgia reconstrutiva, sendo composto por uma artéria e uma veia cutânea direta em sua base, permitindo que uma grande área de pele possa constituir o retalho para recobrir a ferida. Entretanto, a técnica pode apresentar complicações, principalmente com a necrose devido ao comprometimento vascular. Nesse contexto, a ozonioterapia pode ser utilizada para acelerar o processo de cicatrização de feridas pouco vascularizadas e contaminadas. Com o presente estudo, objetivou-se avaliar os efeitos e o reparo do retalho axial dorsal em ratos Wistar, empregando tratamento com óleo ozonizado de alta peroxidação. Utilizaram-se 18 ratos, distribuídos em dois grupos com 9 animais, grupo GG (óleo de girassol comum) e grupo GO (óleo de girassol ozonizado). Durante o período experimental foram realizadas avaliações macroscópicas e microscópicas a fim de observar a cicatrização e a reparação da ferida cirúrgica. Os dados foram submetidos a análise estatística. O aspecto cosmético em GO foi significativamente melhor que GG, e a contagem de vasos sanguíneos, hemorragia e reepitelização foram significativamente maiores em GO quando comparado ao GG. A presença de necrose não diferiu entre os grupos. A média da área total dos retalhos entre os grupos diferiu estatisticamente, sendo maior nos retalhos em GO. Os resultados evidenciaram que a utilização do óleo ozonizado em retalhos de padrão axial resulta em aspecto favorável e melhor reepitelização.

Palavras-chave: ozonioterapia; cirurgia reconstrutiva; angiogênese; colágeno.

Abstract

Axial pattern flap represents an important option in reconstructive surgery, consisting of an artery and a direct cutaneous vein at their base and allowing a large area of skin to form the flap to cover the wound. However, the technique can present complications, mostly necrosis due to vascular involvement. In this context, ozone therapy can be used to accelerate the healing process of poorly vascularized and contaminated wounds. The objective of this article was to evaluate the effects and repair of the dorsal axial flap in Wistar rats at the receiving bed, using treatment with high-peroxidation ozonized oil. The study was carried out with 18 rats, divided into two groups with 9 animals: GG group (common sunflower oil) and GO group (ozonized sunflower oil). During the experimental period, macroscopic and microscopic evaluations were carried out, in order to observe the healing and repair of the surgical wound. Data were submitted to statistical analysis. The cosmetic appearance on GO was significantly better than GG. Blood vessel count, hemorrhage and reepithelialization were significantly higher in GO when compared to GG, while the presence of necrosis did not differ between groups. The mean total area of the flaps between the groups was statistically different, higher in the flaps in GO. The results showed that the use of ozonized oil in an axial pattern flap results in a favorable appearance and better reepithelialization in the treated group.

Keywords: ozone therapy; reconstructive surgery; angiogenesis; collagen.



Introdução

O emprego de cirurgias reconstrutivas, para recobrimento de feridas traumáticas extensas ou após exérese tumoral com amplas margens cirúrgicas, permite o fechamento da ferida e evita o excesso de contratura cicatricial, quando comparado ao fechamento por segunda intenção (Pavletic, 2018). Os retalhos de padrão axial são algumas das opções em cirurgias reconstrutivas, e incorporam uma artéria e veia cutânea direta em sua base (angiossoma), permitindo que uma grande área de pele possa constituir o retalho para recobrir a ferida (Mankin, 2017). O retalho é robusto e não necessita de tecido de granulação do leito receptor, sendo, o principal cuidado, garantir que o angiossoma esteja viável para fornecer o suprimento necessário para sua sobrevivência. Quando ocorre a falha, essa geralmente é parcial, marcada pela necrose na extremidade distal (Pavletic, 2018).

Buscando otimizar o processo e diminuir as falhas pós cirúrgicas, estudos têm sido realizados empregando substâncias que possam auxiliar a cicatrização e estímulo de angiogênese em modelos experimentais de retalho cutâneo dorsal de padrão axial em ratos (Ersel et al., 2016; Pedretti et al., 2017). A ozonioterapia, por sua vez, pode ser utilizada para acelerar o processo de cicatrização de feridas pouco vascularizadas e contaminadas (Kushmakov et al., 2018), entretanto, pouco se sabe sobre o seu uso em cirurgias reconstrutivas. O objetivo deste estudo foi avaliar o reparo tecidual por meio da análise macroscópica e histoquímica de retalho cutâneo de ratos Wistar tratados com óleo ozonizado de alta peroxidação.

Material e Métodos

Foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), saudáveis, machos, adultos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em condições ideais e semelhantes entre si. Para o procedimento cirúrgico os ratos foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico composto por medicação pré-anestésica com midazolam (2mg/kg) e cetamina (40mg/kg) por via intramuscular e posterior aplicação de metadona (1 mg/kg) pela mesma via. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano na dose de 1 a 3% diluído em 100% de oxigênio, utilizando o vaporizador anestésico para manutenção do plano

cirúrgico. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo médico veterinário.

Os animais foram preparados para o procedimento cirúrgico com tricotomia e antisepsia. Para o procedimento, iniciou-se a confecção do retalho cutâneo dorsal seguindo a medida de 10cm de comprimento por 3cm de largura, com a criação dos retalhos conforme a padronização do modelo de McFarlene modificado (Camargo et al., 2014). A demarcação do retalho foi realizada com caneta própria para demarcação em pele (Texta 700®). As referências anatômicas foram o ângulo inferior das escápulas e as cristas ilíacas, centralizado sobre a coluna vertebral.

Em condições estéreis, após a incisão para demarcar o retalho (Figura 1A), este foi divulsionado incluindo o panículo carnosos até a base cranial para ser elevado (Figura 1B) e reposicionado de volta ao leito original para dermorráfia com sutura em padrão simples interrompido, com pontos equidistantes a cada 1 cm, utilizando fio de Nylon 3-0 (Figura 1C). Os animais receberam nos sete dias subsequentes, pela via intradérmica, cloridrato de peptidina (10mg/kg), a cada 24 horas para analgesia.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, sendo nove ratos pertencentes ao grupo tratado com óleo de girassol comum (GG) e nove ratos pertencentes ao grupo tratado com óleo de girassol ozonizado (GO). O tratamento foi realizado mediante aplicação de 1ml de óleo de girassol comum ou óleo de girassol ozonizado (concentração de 70 µg/mL) nos grupos GG e GO, respectivamente. Foi utilizado produto obtido estéril de forma comercial. A aplicação foi feita por via tópica, diretamente na pele, entre o retalho e o leito receptor no momento trans cirúrgico e no pós-operatório, por via tópica (duas vezes por dia), na superfície do retalho, por 7 dias consecutivos (Figura 2).

A avaliação macroscópica foi realizada no 3º, 7º e 14º dias de pós-operatório. As variáveis observadas foram presença de edema, exsudato, necrose, coloração e aspecto cosmético, sendo as variáveis quantificadas de 0 a 4, exceto a necrose, quantificada de 0 (ausente) ou 1 (presente), conforme preconizado por Paim et al. (2002). No 15º dia de pós-operatório todos os animais foram submetidos à eutanásia.

As medidas do retalho foram coletadas pelo método de gabarito descrito por Sasaki e Pang (1980) e calculadas em cm² pelo *software* Image J®.

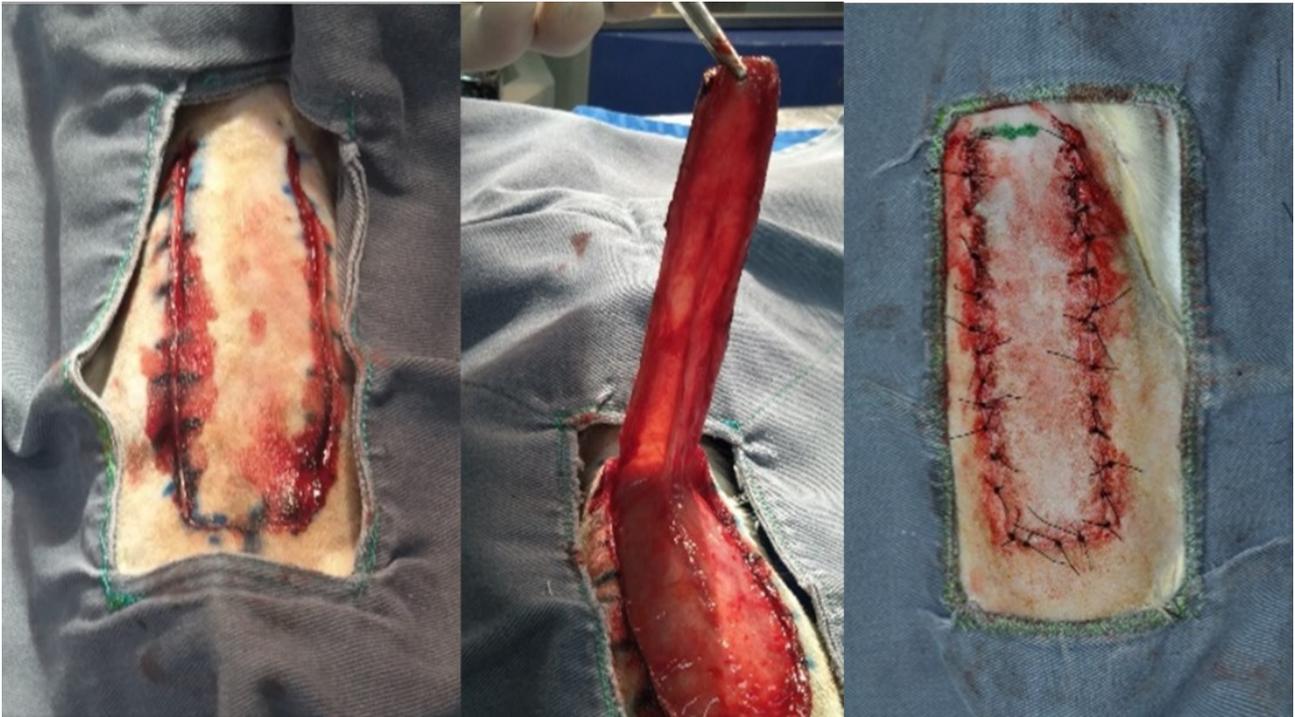


Figura 1. Imagem fotográfica do procedimento cirúrgico visando a confecção de retalho cutâneo dorsal em rato Wistar. (A) Incisão do retalho com base cranial com auxílio de bisturi. (B) Elevação do retalho após incisão da pele, divulsão do tecido subcutâneo e panículo carnoso. (C) Dermorrafia com nylon 3-0 em pontos simples separado após reposicionamento do retalho no leito doador.

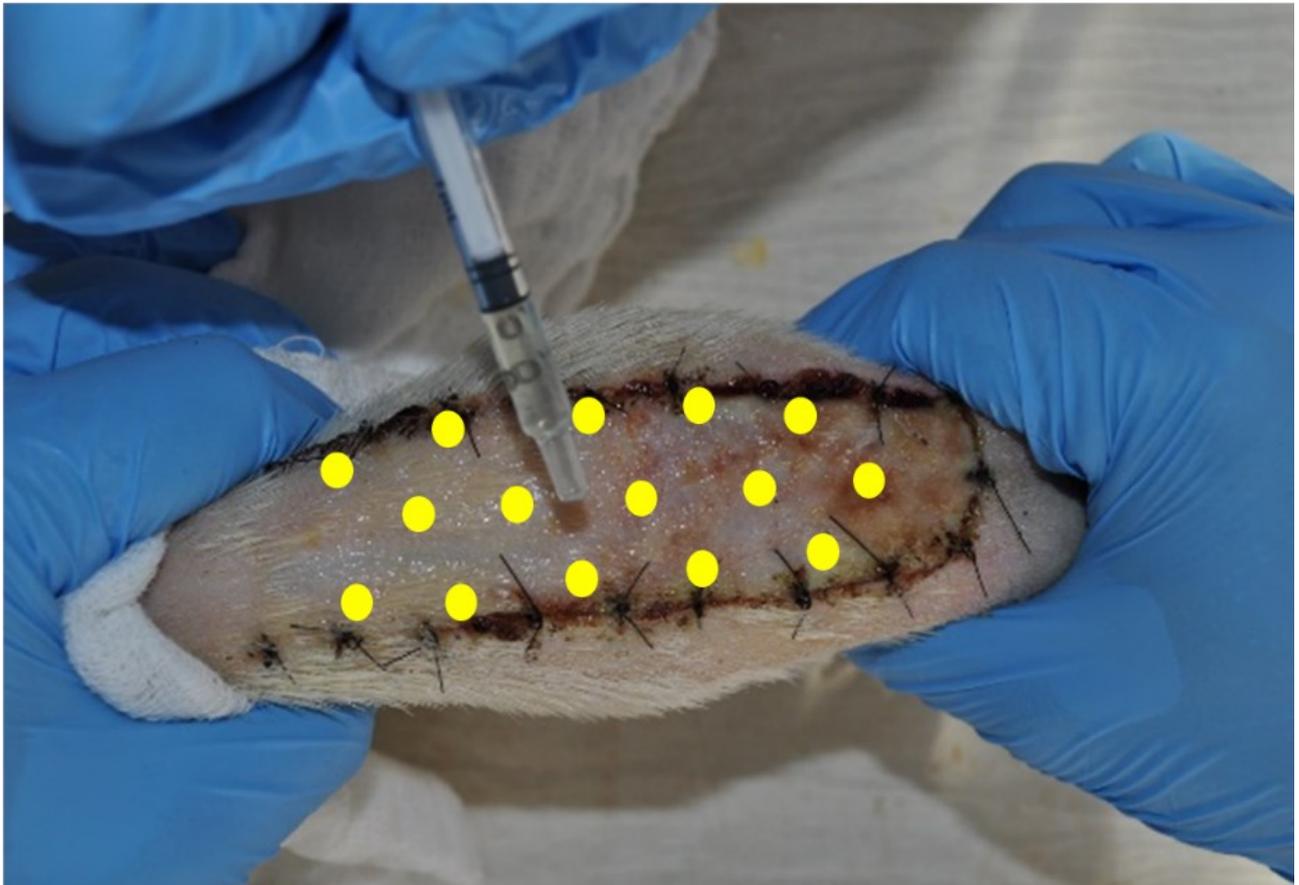


Figura 2. Imagem fotográfica do retalho cutâneo demonstrando esquematicamente a distribuição da aplicação do óleo sobre o retalho e ao redor da ferida cirúrgica com auxílio de uma seringa de 1 ml.

Três amostras de cada retalho foram coletadas e posteriormente processadas conforme a rotina convencional de processamento histológico. As amostras obtidas foram coradas pelo método histoquímico de rotina com Hematoxilina e Eosina (HE) e com a coloração de *Picrosirius Red* (Campos et al., 2007) para avaliação do tipo de colágeno.

Na coloração de HE foram avaliadas a epiderme e derme quanto à presença de necrose, células polimorfonucleares, células mononucleares, hemorragia e reepitelização. Os dados obtidos foram classificados de acordo com a intensidade em que foram encontrados e transformados em variáveis semiquantitativas mediante atribuição de índice para o achado histológico, conforme preconizado por Garros et al. (2006) e registrados em fichas individuais para cada animal. A quantificação de vasos foi determinada pela técnica de contagem de microvasos, sendo considerado um vaso unitário qualquer grupo de células endoteliais, assim como vasos contendo hemácias em seu lúmen. A contagem foi realizada em cinco campos, previamente selecionados pela maior densidade vascular na profundidade da lesão com microscópio ajustado para uma ampliação de 400x e expresso em um valor médio de vasos para cada caso estudado semelhante ao estudo realizado por Pazzini et al. (2017).

Para a avaliação do colágeno foi empregada a coloração de *Picrosirius*. Os dados foram analisados por microscopia sob luz polarizada (Olympus BX-53®, Japão). A observação das fibras colágenas por esse método permitiu a diferenciação do colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (verde). De cada lâmina foram selecionados e fotomicrografados dez campos histológicos com uma câmera digital (5,0 megapixels) no aumento de 20x. As imagens foram analisadas com o auxílio do software Image J®, com o plug-in Color Threshold, obtendo-se o percentual de colágeno pela análise de partículas automatizadas de acordo com a seleção e extensão das áreas baseadas na cor.

A análise dos cortes histológicos foi realizada pelo mesmo patologista sem o conhecimento prévio da identificação dos grupos. A avaliação histológica das lâminas foi realizada em microscópio óptico no aumento de 400x. As fotomicrografias foram realizadas no programa Motic Images Plus 2.0.

Para as análises estatísticas relacionando as variáveis categóricas macroscópicas foi realizado a

correlação entre o grupo controle e experimental utilizando a correlação de Pearson. Em todos os testes, valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($p \leq 0,05$) foram considerados significativos. As médias obtidas das avaliações microscópicas e porcentagem das avaliações macroscópicas em relação ao grupo controle e experimental foram submetidas à análise de variância (ANOVA) com diferença significativa entre as médias ($p \leq 0,05$). Os dados de colagenização dos diferentes tipos de fibras colágenas, segundo o grau de diferenciação foram comparados por análise de variância (ANOVA) para um delineamento inteiramente ao acaso, considerando os valores de p iguais ou inferiores a 0,05. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa computacional R.

Resultados

Dentre os 18 animais inicialmente utilizados para o estudo, um foi excluído do experimento por óbito, restando um total de 17 animais distribuídos em: oito animais do grupo tratado com óleo de girassol ozonizado (GO) e nove animais tratados com óleo de girassol comum (GG).

Na avaliação macroscópica, observou-se que o retalho cutâneo apresentou evolução para necrose na porção médio distal da ferida em todos os animais, iniciando-se com exsudação, edema e hiperemia até o 3º dia, progredindo para necrose bem delimitada a partir do 10º dia de pós-operatório (Figura 3). Entretanto, em todos os tempos avaliados de pós-operatório o aspecto cosmético foi significativamente ($p = 0,046$) melhor no grupo GO em relação ao grupo GG, conforme demonstrado pela comparação das qualidades macroscópicas (Tabela 1).

A porcentagem de necrose dos dois grupos foi avaliada, e a média da porcentagem da necrose de GG e GO foi 62,82% (35,51 - 85,21) e 50,82% (30,922 - 77,71) respectivamente. Os valores mostram que não houve diferença significativa referente à porcentagem de necrose entre os dois grupos. Os valores médios da área total do retalho de GG e GO foram 25,24 cm² ($\pm 7,14$) e 31,83 cm² ($\pm 3,28$) respectivamente. Os valores, à análise de variância (ANOVA), demonstraram diferença significativa ($p = 0,000031$) em GO em relação a GG.

Para a avaliação histológica, a média da quantificação de vasos, hemorragia e reepitelização foi significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Em GG a média de vasos foi 3,64 ($\pm 13,53$) e para GO a média de vasos foi 14,45 ($\pm 17,83$) (Figura 4). Os

fatores hemorragia ($p=0,03$) e reepitelização ($p=0,01$) (Figura 5) foram significativamente maiores em GO em relação a GG. Quanto à presença de células mononucleares (macrófagos) e polimorfonucleares (neutrófilos) não foram observadas diferenças significativas entre o GG e GO ($p=0,46$ e $p=0,37$, respectivamente).

Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos GO e GG em relação as porcentagens do colágeno tipo I (vermelho - maduro) e tipo III (verde - imaturo) (Figura 6). Em ambos os grupos se observou predomínio das fibras de colágeno tipo I em comparação ao colágeno tipo III (Figura 7).

Tabela 1. Evolução qualitativa macroscópica de coloração, necrose, exsudato, edema e aspecto cosmético, nos dias 3, 7 e 14 do pós-operatório, nos grupos GO (óleo de girassol ozonizado) e GG (óleo de girassol comum).

Característica macroscópica	GG			GO		
	Dias pós-operatório					
	3º dia	7º dia	14º dia	3º dia	7º dia	14º dia
Edema	Moderado	Moderado/Discreto	Discreto	Moderado	Moderado/Discreto	Discreto
Exsudato	Moderado	Discreto	Ausente	Moderado	Discreto	Ausente
Aspecto cosmético	Bom	Bom/Regular	Regular	Excelente/Bom	Bom	Bom
Necrose	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente
Coloração	Hiperêmico	Hiperêmico	Enegrecido	Hiperêmico	Pálido	Enegrecido

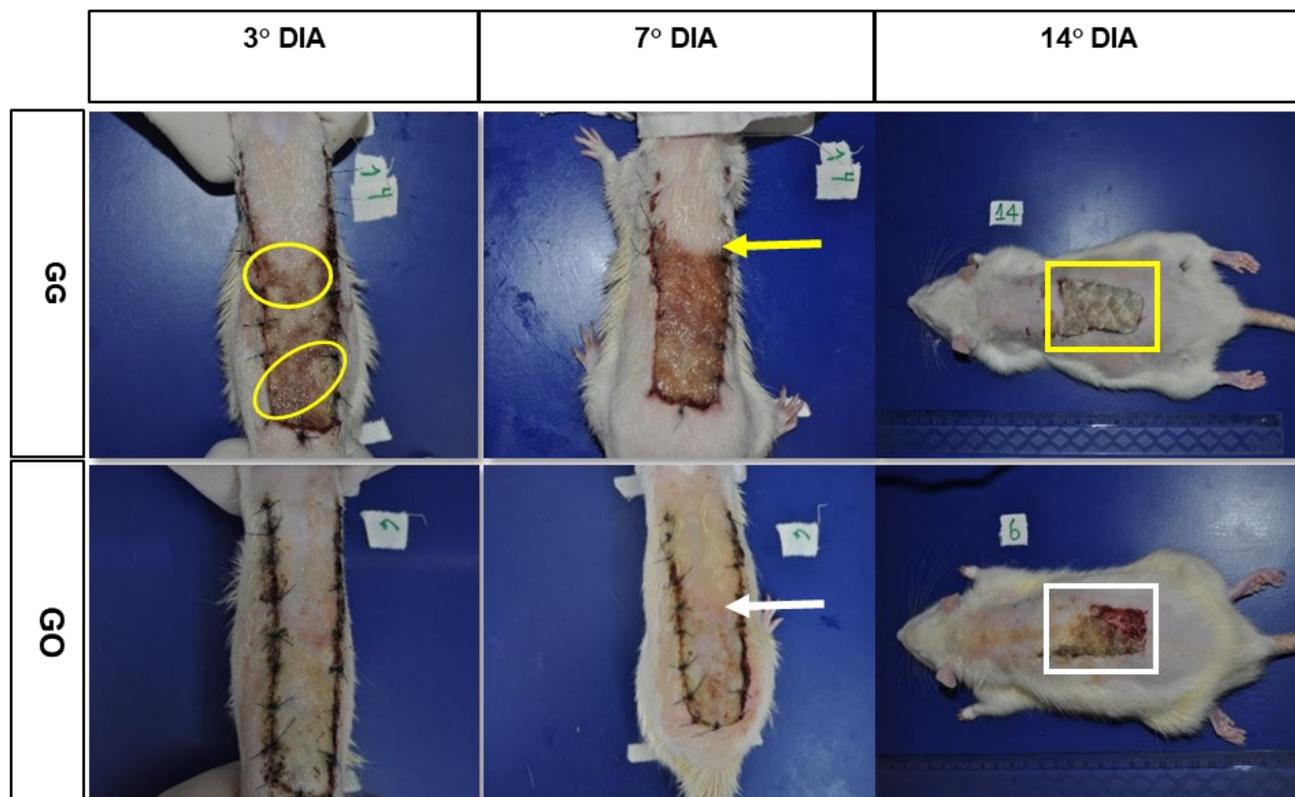


Figura 3. Fotografias comparativas dos retalhos cutâneos dorsais em ratos nos grupos GG (óleo de girassol comum) e GO (óleo de girassol ozonizado) nos três momentos de avaliação. Aparência do retalho cutâneo no 3º dia (A e D), 7º dia (B e E) e 14º dia (C e F) de pós-operatório. Notar área hemorrágica da porção distal do retalho (círculos). Notar a demarcação da área de necrose e área viável (seta amarela). Observar área pálida bem demarcada por uma linha horizontal (seta branca). Notar a diferença de retração cicatricial do GG (retângulo amarelo) e GO (retângulo branco).

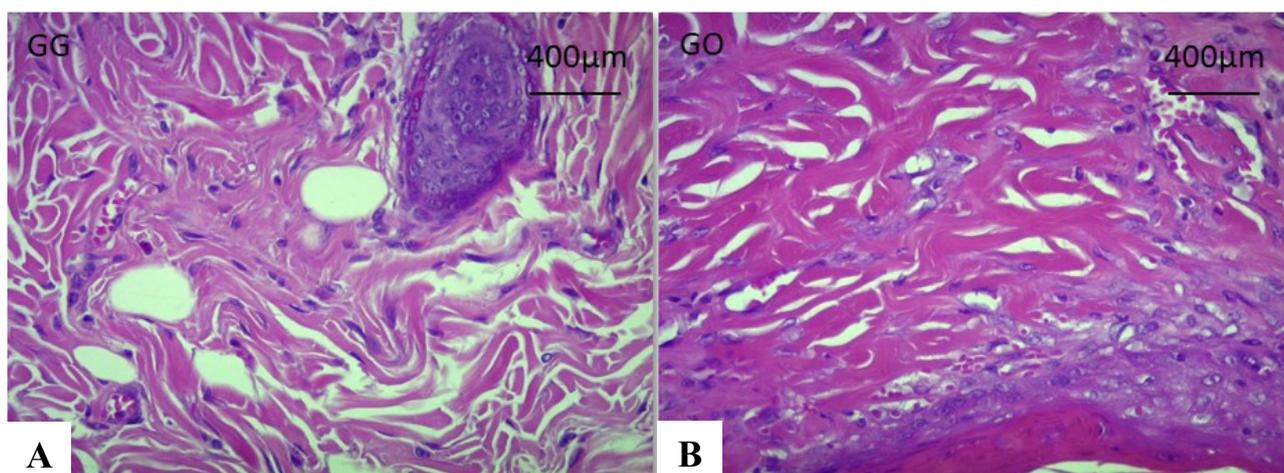


Figura 4. Fotomicrografia da derme de rato submetido ao procedimento cirúrgico. (A) Vaso sanguíneo identificado (seta) no grupo GG (óleo de girassol comum). (B) Presença de maior neovascularização na área circunscrita e identificação de vasos (seta) no grupo GO (óleo de girassol ozonizado). Coloração Hematoxilina e Eosina (HE) em aumento de 400x.

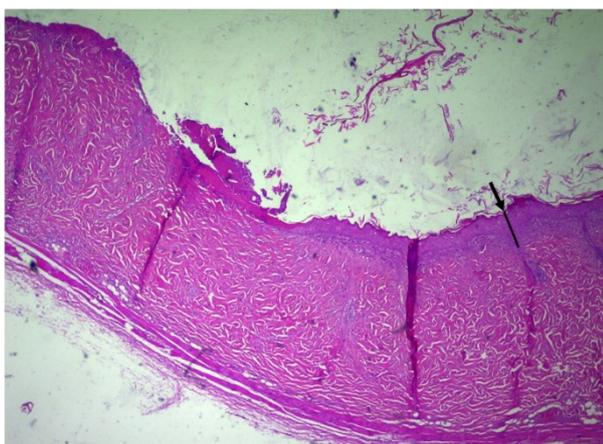


Figura 5. Fotomicrografia de derme e epiderme em ratos submetidos ao procedimento cirúrgico. Notar a intensidade da reepitelização (seta) dos ratos tratados com óleo de girassol ozonizado. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE) em aumento de 200X.

Discussão

Os efeitos pró angiogênicos do óleo ozonizado já foram relatados (Kirkil et al., 2016), embora o seu mecanismo de ação sobre os retalhos cutâneos não esteja completamente elucidado.

Áreas de necrose podem ocorrer após procedimentos dessa natureza, devido à reperfusão pós-isquêmica. A lesão ocorre após a injúria tecidual que desencadeia um aumento de radicais livres em níveis críticos, logo após a reperfusão de sangue aos tecidos. O organismo possui mecanismos antioxidantes endógenos, no entanto, estes são insuficientes para equilibrar o estresse oxidativo, o que gera a lesão tecidual por peroxidação lipídica da membrana celular (Freitas et al., 2002; Cymrot et al., 2004).

Neste contexto, considerando as elevadas taxas de necrose, e dificuldades relacionadas à cicatrização, associadas a cirurgias reconstrutivas, empregou-se o óleo ozonizado, que apresenta propriedades como sinalizador do estresse oxidativo, responsável por estimular a via antioxidante endógena (Valacchi et al., 2011). Contudo, mais estudos são necessários para quantificar a capacidade antioxidante da ozonioterapia.

A concentração de óleo ozonizado utilizada no estudo (70mcg/ml) está disponível comercialmente e é empregada para o reparo de feridas cutâneas, por ser considerado de alta peroxidação (Smith et al., 2017). A determinação do índice de peroxidação do óleo ozonizado no reparo de ferida é importante, a fim de padronizar estudos futuros e correlacionar os efeitos encontrados à concentração do produto (Valacchi et al., 2011).

Collins et al. (2000) demonstraram que a vascularização do retalho cutâneo permanece dependente da vascularização do pedículo até o 7º dia, e a partir desse momento os vasos neoformados do leito receptor passam a auxiliar na vascularização, com a neovascularização se mostrando suficiente para manutenção do retalho a partir do 10º dia. No presente estudo optou-se pela observação por 14 dias após procedimento cirúrgico, de forma a assegurar a definição completa da área de necrose do retalho. Dessa forma, a área de necrose e a área viável ficaram definidas a partir do décimo dia.

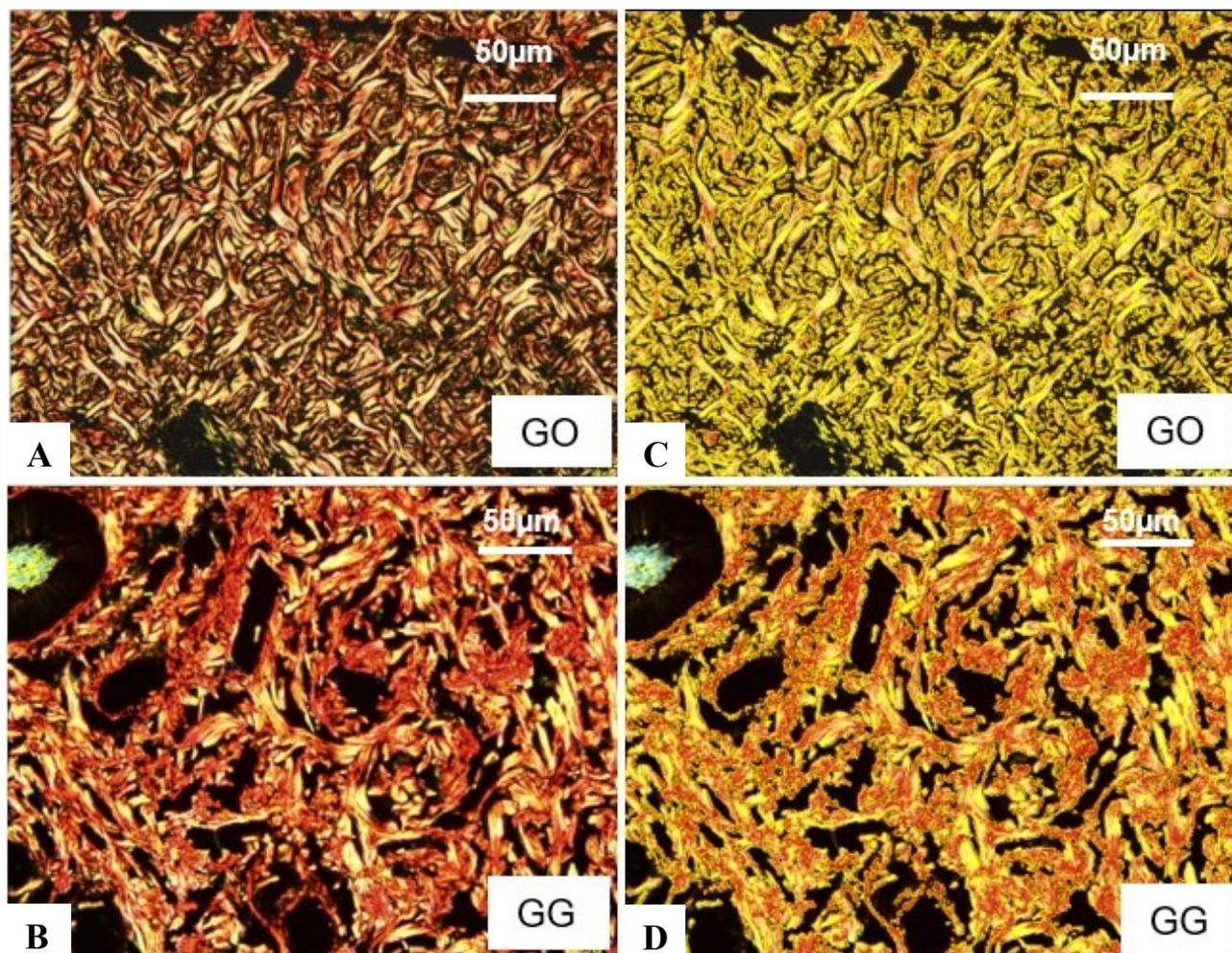


Figura 6. Fotomicrografia com microscópio de luz polarizada (Olympus BX-53) das áreas de transição dos retalhos cutâneos dorsais de ratos da linhagem Wistar após 15 dias de pós-operatório. A e B: Fotomicrografia empregando *software* Image J delimitam em amarelo o local de captura das imagens para quantificação de colágeno tipo III (fibras em verde) nos grupos GO (óleo de girassol ozonizado) e GG (óleo de girassol comum). C e D: Fotomicrografia analisada pelo *software* Image J delimitam em amarelo o local de captura das imagens para quantificação de colágeno tipo I (fibras em vermelho) nos grupos GO (óleo de girassol ozonizado) e GG (óleo de girassol comum). Coloração de Picrosirius Red em aumento de 500x.

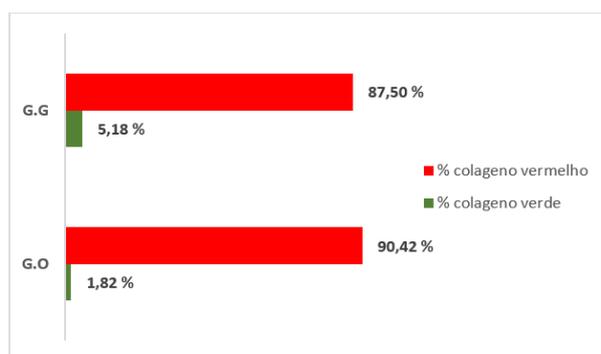


Figura 7. Representação gráfica em colunas da porcentagem média de expressão de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) para o grupo GG (óleo de girassol comum) e GO (óleo de girassol ozonizado). Observar predominância de colágeno vermelho em ambos os grupos. Entre grupos não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

No presente trabalho não foi observada diferença estatística entre grupos quanto à porcentagem média de necrose do retalho após 14 dias de tratamento. De modo semelhante, no estudo de Kirkil et al. (2016), que avaliou a viabilidade de retalhos cutâneos em ratos tratados com azeite de oliva ozonizado após 7 dias, também não foram observadas diferença entre grupos referente a porcentagem média de necrose do retalho (Kirkil et al., 2016).

No trabalho de Gorgulu (2016) a porcentagem média de necrose em retalhos cutâneos com pedículo cranial foi de 54,54% (13,80-81,20), comparado aos 50,82% (30,922 - 77,71) do GO e 62,82% (35,51 - 85,21) do GG deste estudo. Em todos os retalhos cutâneos foi observado necrose na porção médio distal, o que demonstra padronização e consistência técnica (Cymrot et al., 2004; Camargo et al., 2014).

A contagem de microvasos para a determinação do índice de angiogênese foi determinada pelo método quantitativo, seguindo padronização proposta por Pazzini et al. (2017). Observou-se que o grupo GO apresentou porcentagem média de vasos maior que o grupo controle o que corrobora com o trabalho Kirkil et al. (2016), comprovando efeitos benéficos do óleo ozonizado para a neovascularização e consequentemente melhor reparo de feridas dérmicas em ratos.

Estudos anteriores demonstraram que o óleo ozonizado estimula a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) associado a maior contagem de vasos (Xiao et al., 2017). A expressão de VEGF foi identificada em fibroblastos dérmicos, células endoteliais e fibras de colágeno (Kim et al., 2009).

A presença discreta de células mononucleares e polimorfonucleares pode ser justificada pelo tempo de avaliação da ferida (14 dias) quando o material foi coletado, momento esse em que o tecido já não se encontrava na fase inflamatória.

Ao se avaliar o colágeno total e as diferentes fibras colágenas (tipo I e III), mesmo na ausência de diferença significativa entre as variáveis categóricas, foi possível observar na microscopia óptica uma melhor organização das fibras colágenas do GO em relação ao GG em 14 dias. Com isso podemos inferir uma correlação positiva entre a qualidade do colágeno e o tamanho total do retalho, que foi melhor no GO.

Estudos apontam que a atividade do óleo ozonizado no processo de reparo de feridas dérmicas, leva a um melhor fechamento da ferida com melhor deposição de colágeno e maior atividade de fibroblastos após sete dias de ferida, durante a formação do tecido de granulação e fase inicial de remodelação do tecido de cicatrização (Kim et al., 2009; Travagli et al., 2010; Xiao et al., 2017). Esta avaliação não foi possível no presente estudo, uma vez que a coleta do material foi realizada após 15 dias de tratamento.

A maior área total do retalho cutâneo em GO observada na avaliação macroscópica permite inferir a correlação à uma menor fibrose cicatricial. Uma hipótese seria a ação dos miofibroblastos nas propriedades mecânicas do tecido, com a sua permanência na lesão levando à fibrose cicatricial excessiva (Masseno et al., 2010). Mais estudos devem ser avaliados dentro do contexto biomecânico.

A maior reepitelização observada no GO, permitiu considerar o óleo de girassol ozonizado como fator positivo para a reepitelização tecidual, sendo esse achado condizente com Pazzini et al. (2016), que demonstrou que a aplicação de plasma rico em plaquetas promoveu maior angiogênese e consequente maior reepitelização em enxertos cutâneos.

Conclusão

O óleo ozonizado influenciou na vitalidade do retalho cutâneo e no processo de reparação tecidual. Os animais tratados com óleo ozonizado apresentaram neovascularização e aspecto cosmético superiores aos do grupo controle que apresentaram menor fibrose cicatricial. Entretanto, em nenhum dos grupos foi observada modificação na porcentagem de necrose distal do retalho cutâneo. Assim, observou-se, no presente trabalho, uma influência positiva da utilização do óleo ozonizado sobre o processo de reparação do retalho cutâneo dorsal em ratos.

Conflito de Interesse

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, protocolo nº011163/18.

Referências

- Camargo, C.P. et al. Description of a new experimental model skin flap for studying skin viability in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 29(3): 166-170, 2014.
- Campos, A.C.L.; Borges-Branco, A.; Groth A.K. Cicatrização de feridas. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 20(1): 51-58, 2007.
- Collins, T.; Cotran, R.S.; Kumar, V. Inflamação aguda e crônica. In: *Patologia estrutural e funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.44-78.
- Cymrot, M.; Precário, S.; Ferreira, L.M. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 19(1): 18-26, 2004.
- Ersel, M. et al. Effects of Silk Sericin on Incision Wound Healing in a Dorsal Skin Flap Wound

- Healing Rat Model. **Medical Science Monitor**, 22: 1064-1078, 2016.
- Freitas, F.A.S. et al. Estudo da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 17(suppl 3): 74-78, 2002.
- Garros, I.C. et al. Extrato de passiflora edulis na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 21(suppl 3): 55-65, 2006.
- Gorgulu, T. Selection of Appropriate Pedicle for Dorsal Skin Flap Studies on Rats. **The Medical Bulletin of Sisli Etfal Hospital**, 50(2): 93-96, 2016.
- Kim, S.H. et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. **Journal of Korean Medical Science**, 24(3): 368-374, 2009.
- Kirkil, C. et al. The effect of ozonated olive oil on neovascularization in a experimental skin Flap model. **Advances in Skin and Wound Care**, 29(7): 322-327, 2016.
- Kushmakov, R. et al. Ozone therapy for diabetic foot. **Medical Gas Research**, 8(3): 111-115, 2018.
- Mankin, K.T. Axial Pattern Flaps. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, 47(6): 1237-1247, 2017.
- Masseno, A.P.B. et al. Miofibroblastos: Revisão de literature. **Veterinária e Zootecnia**, 17(2): 177-190, 2010.
- Paim, C.B.V. et al. Enxerto autólogo de pele, em malha, com espessura completa, na reparação de feridas carpometacarpianas de cães: resposta à irradiação laser AsGa. **Ciência Rural**, 32(3): 451-457, 2002.
- Pavletic, M.M. Axial Pattern Skin Flaps. In: **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. 1st ed. Iowa: John Wiley & Sons, 2018. pp.417-462.
- Pazzini, J.M. et al. Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracodorsal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(2): 108-118, 2016.
- Pazzini, J.M. et al. Histochemical and Immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 37(12): 1519-1525, 2017.
- Pedretti, S.L.C. et al. Effects of dimethylsulfoxide and pentoxifylline in the vitality of cutaneous flaps in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, 44 (05): 457-464, 2017.
- Sasaki, G.H.; Pang C.Y. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 65(2): 152-158, 1980.
- Smith, N.L.; Wilson, A.L.; Gandhi, J.; Vatsia, S.; Khan, S.A. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, 7(3): 212-219, 2017.
- Travagli, V. et al. Ozone and ozonated oil in skin disease: A review. **Mediators Inflammation**, 2010: 610418, 2010.
- Valacchi, G. et al. Ozonated sesame oil cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair and Regeneration**, 19(1): 107-115, 2011.
- Xiao, W. et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Bioscience Reports**, 37(6): BSR20170658, 2017.