



Grupo Ser Educacional  Gente criando o futuro

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM  
MESTRADO**

**MARKINOKOFF LIMA E SILVA FILHO**

**EFEITO DA OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE  
ÚLCERAS EM PÉS DIABÉTICOS: REVISÃO  
SISTEMÁTICA E METANÁLISE**

**Guarulhos**

**2019**

**MARKINOKOFF LIMA E SILVA FILHO**

**EFEITO DA OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE  
ÚLCERAS EM PÉS DIABÉTICOS: REVISÃO  
SISTEMÁTICA E METANÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Guarulhos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. André Oliveira Paggiaro

**Guarulhos**

**2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca**

S586e

Silva Filho, Markinokoff Lima e

Efeito da Ozonioterapia no tratamento de úlceras em pés diabéticos:  
revisão sistemática e metanálise / Markinokoff Lima e Silva Filho. -- 2019.  
57 f.; 31 cm.

Orientador: Profº. Dr.: André Oliveira Paggiaro

Dissertação (Mestre em Ciências.) – Programa de Pós-Graduação em  
Enfermagem, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2019.

1. Pé diabético 2. Ozônio 3. Desbridamento 4. Úlcera 5. Cicatrização I.  
Título II. Paggiaro, André Oliveira (Orientador). III. Universidade Guarulhos

CDD. 610.73



Grupo Ser Educacional



Gente criando o futuro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, intitulada “Efeito da ozonioterapia no tratamento de úlceras em membros inferiores de pacientes diabéticos: revisão sistemática e metanálise”, em sessão pública realizada em 04 de fevereiro de 2019, considerou o candidato **Markinokoff Lima e Silva Filho** aprovado.

1. Prof. Dr. André Oliveira Paggiaro

2. Profa. Dra. Viviane Fernandes de Carvalho

3. Prof. Dr. César Isaac

*É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua produção total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que citada a fonte.*

## DEDICATÓRIA

- À Deus, autor do meu destino: que me guia pelos melhores e mais desafiadores caminhos, revelando quem sou e mostrando do que sou capaz.

- À vovó Moêmia, investidora dos meus sonhos: que nunca mediu esforços para priorizar meus estudos, soube ser pilar de nossa família e por meio de suas palavras de apoio, seu exemplo de vida e seu amor incondicional, foram ótimos moldes para a formação da pessoa que sou hoje.

- À minha irmã Anne, parceira de caminhada: fiel apoiadora das minhas decisões, vibrando e torcendo a cada nova oportunidade.

- Aos meus pais: Pelo amor ofertado a cada novo desafio.

- À vovô Dobico, meu primeiro incentivador: àquele que já apostou, vibrou e comemorou nas primeiras conquistas. Que hoje deve estar ao meu lado, com um belo sorriso, recompensado e erguendo os braços em comemoração a cada novo passo alcançado.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar a realização dos meus sonhos e me guiar nos melhores caminhos.

À minha família, pelo apoio e incentivo que me fazem permanecer firme na direção dos meus objetivos.

Aos meus amigos, Gustavo Castro, Ariana Araújo, Elba Miranda, Jane Grace, Jesus Peñaloza, Jéssyca Souza e Kaio Keomma, que foram grandes incentivadores e os melhores presentes dessa vida paulista.

Aos meus amigos de mestrado e residência, pela parceria e encorajamento diário.

Ao Prof. Dr. André Oliveira Paggiaro, pela orientação, paciência e ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Viviane Fernandes de Carvalho e Prof. Dr. César Isaac, pela presença e colaboração com a avaliação desta dissertação.

À minha prima Josiane Gusmão, pela sabedoria nas palavras, carinho nos conselhos e exemplo na caminhada.

À minha tia Fátima e aos meus primos Ivan, Tânia e Luquinhas pelo suporte, atenção e carinho ofertados durante meu início nessa trajetória.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

*São milhões de pensamentos  
que não saem da cabeça.  
E antes que eu me esqueça  
registro esses momentos  
com poesia e sentimentos  
desde os tempos de menino.*

*Talvez fosse o meu destino,  
nascido prá escrever  
aquilo que faz bater  
um coração nordestino.*

**Bráulio Bessa**

## RESUMO

**Introdução:** As úlceras diabéticas não seguem um curso habitual no processo de cura, podendo ficar estagnadas em diferentes estágios e, portanto, não conseguem cicatrizar de maneira adequada ou oportuna. A todo momento novas alternativas terapêuticas estão sob investigação. Estudos demonstraram que a terapia com ozônio estimula a ação enzimática antioxidante, regula a produção de fatores de crescimento, aumenta a infusão sanguínea local e fornece atividade antibacteriana. **Objetivo:** Buscamos analisar o nível de evidência da ozonioterapia no tratamento de úlceras nos pés de pacientes com Diabetes mellitus. **Método:** Foi realizada uma Revisão sistemática com metanálise, utilizando o Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) como um checklist para nortear a redação da revisão. Foram feitas buscas de ensaios clínicos, publicados e indexados nas bases de dados Pubmed, Embase e Web of Science até janeiro de 2019. Os estudos selecionados incluíram indivíduos humanos de qualquer idade com DM tipo 1 ou tipo 2 e com úlcera ativa no pé, que receberam a Ozonioterapia como proposta principal de tratamento em forma de gás, água ou na forma oleosa. Resultados, incluindo: número de úlceras curadas, redução da área da úlcera, duração da internação, alterações nos níveis de glicose, atividade antioxidante e número de amputações foram analisados. Os termos de busca (mesh terms) foram definidos utilizando a estratégia PICO. **Resultados:** Inicialmente, 61 estudos foram identificados; no entanto, apenas 06 atenderam a todos os critérios de elegibilidade para inclusão na amostra final. Um total de 496 pacientes foram avaliados nos estudos selecionados distribuídos em grupo controle ou intervenção, num tempo de seguimento que variou de 14 aos 180 dias. Verificou-se que não houve diferença significativa entre a intervenção e o controle quando avaliado a redução da área da ferida, já os pacientes que receberam terapia de ozônio apresentaram taxas mais altas de cicatrização (isto é, úlceras curadas), foram observadas estadias de hospitalização mais curtas, observou-se um aumento da atividade da catalase, redução dos níveis de glicose no sangue e menores taxas de amputação. **Conclusões:** Há um número ainda insuficiente de ensaios clínicos, todos com um baixo nível de evidência em relação à ozonioterapia no tratamento de úlceras no pé diabético. Mesmo com o aumento observado no número de úlceras cicatrizadas e com os demais resultados apresentados, houve risco considerável de viés nos estudos avaliados, onde a maior parte dos ensaios foi classificada como de alto risco de viés em todos os domínios avaliados. Ainda que pareça ser uma terapia adjuvante promissora, o risco de viés apresentado pode provocar prejuízo na validade interna dos ensaios analisados, e conseqüentemente, impedem que esta revisão sistemática consiga apresentar resultados mais contundentes sobre a eficácia desta terapia. Assim, mais estudos científicos, de melhor qualidade, são necessários sobre o assunto para assegurar ainda mais sua prática clínica.

**Descritores:** Pé diabético, Ozônio, Desbridamento, Úlcera, Cicatrização.



## ABSTRACT

**Introduction:** Diabetic ulcers do not follow the usual course in the healing process, and may stagnate at different stages. As a consequence, these wounds do not heal a proper or timely manner. Studies have shown that ozone therapy stimulates antioxidant enzyme expression and activity, regulates growth factor production, increases local blood flow and provides antibacterial protection.

**Objective:** We sought to analyze the evidence related to the use of ozone therapy in the treatment of diabetic foot ulcers. **Method:** A systematic review and meta-analysis was conducted using published clinical trials, indexed in the PubMed, Embase and Web of Science databases until January 2019. Outcomes, including: number of ulcers cured, ulcer area reduction, hospital stay length, changes in blood glucose levels, antioxidant activity and number of amputations were analyzed. **Results:** Initially, 61 studies were identified; however, only 06 met all of the eligibility criteria for inclusion in the final sample. A total of 496 patients, in control or intervention groups, were evaluated in the selected studies. It was found that patients receiving ozone therapy displayed higher rates of healing (i.e. cured ulcers), shorter hospitalization stays, increased catalase activity, and reduced blood glucose levels and lower amputation rates. **Conclusions:** There was a low level of evidence regarding ozone therapy and diabetic foot ulcer treatment. Positive interference in the number of healed ulcers was observed, but there was a considerable risk of bias in the studies evaluated. More scientific studies are needed on the subject, but it appears to be a promising adjuvant therapy.

**Keywords:** Diabetic foot; Ozone; Debridement; Ulcer; Wound healing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**FIGURA 1:** Fluxograma da estratégia de busca para seleção dos artigos estudados.

**FIGURA 2:** Resumo da qualidade do risco de viés: julgamento dos autores a respeito de cada item da qualidade do viés incluso no estudo.

**FIGURA 3:** Gráfico da qualidade do risco de viés: julgamento da revisão dos autores a respeito de cada item disposto através porcentagem dos estudos incluídos.

**FIGURA 4:** Gráfico de floresta sobre a Número de úlceras curadas.

**FIGURA 5:** Gráfico de floresta sobre a Redução da área da úlcera.

**FIGURA 6:** Gráfico de floresta sobre o Tempo de Internação.

**FIGURA 7:** Gráfico de floresta sobre a taxa de amputação.

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1** - Características dos pacientes dos estudos selecionados

**TABELA 2** - Características metodológicas dos estudos selecionados.

**TABELA 3-** Dados referentes aos desfechos avaliados nesta revisão sistemática.

**TABELA 4-** Dados referentes aos achados da Análise do Sistema Antioxidante.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>3 MÉTODO.....</b>	<b>21</b>
Critérios de seleção.....	21
Tipos de participantes .....	21
Tipos de intervenções .....	22
Tipos de desfechos .....	22
Estratégia de busca.....	22
Seleção dos estudos... ..	23
Coleta de dados.....	24
Avaliação de risco de viés da amostra.....	24
Análise estatística.....	24
<b>4 RESULTADO.....</b>	<b>25</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>54</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica, de alta prevalência, caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue, às custas da produção deficitária de insulina ou da resistência periférica ao hormônio<sup>1</sup>.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o DM é o terceiro fator, em importância, da causa de mortalidade prematura, superado apenas por hipertensão arterial e tabagismo<sup>2</sup>. Avaliações globais de prevalência do DM mostraram aumento da doença nos últimos 15 anos. As últimas estimativas ultrapassaram projeções previamente realizadas<sup>3</sup>. Pesquisa realizada em 2013 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e pelo Ministério da Saúde do Brasil, identificou que 6,2% da população brasileira com 18 anos ou mais de idade referiu diagnóstico médico de diabetes, com maior taxa nos indivíduos sem instrução ou com ensino fundamental incompleto<sup>2</sup>.

Evidenciado como um importante e crescente problema de saúde para todos os países, o diabetes atinge cerca de 8,8% da população mundial entre 20 a 79 anos de idade, o que corresponde a 415 milhões de pessoas<sup>2</sup>. Percebendo esse crescimento na incidência de diabéticos, recomendações são dadas, visando mudar comportamentos para reduzir danos futuros, por meio de uma boa alimentação, prática regular de exercícios físicos, interrupção do tabagismo, uso correto de medicações e, se possível, monitorização dos níveis de açúcar no sangue regularmente<sup>4</sup>.

As mais recentes evidências mostram que o diabetes continua a ser uma grande e crescente sobrecarga na saúde global e é provável que continue a crescer substancialmente nas próximas décadas<sup>3</sup>. Além de representar uma

importante carga financeira para indivíduos portadores e suas famílias, o diabetes também tem um relevante impacto econômico nos países e nos sistemas de saúde <sup>2</sup>.

Complicações agudas do DM incluem a hipoglicemia, cetoacidose diabética, estado hiperglicêmico hiperosmolar, coma diabético hiperglicêmico, convulsões ou perda de consciência e infecções<sup>1</sup>. A hiperglicemia crônica, se não controlada, causa danos a longo prazo como disfunção e falha de diferentes órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, levando ao desenvolvimento de incapacitação e complicações de saúde com risco de vida <sup>1,5</sup>. As complicações microvasculares causam nefropatia, neuropatia e retinopatia, como também, complicações macrovasculares na doença arterial coronariana (DAC) levando à angina ou infarto do miocárdio, doença arterial periférica (DAP) contribuindo para acidente vascular cerebral ou encefalopatia diabética <sup>1</sup>.

Pé Diabético é o termo empregado para nomear as diversas alterações e complicações ocorridas, isoladamente ou em conjunto, nos pés e nos membros inferiores dos diabéticos <sup>6</sup>. É ainda conceituado como “infecção, ulceração e/ou destruição de tecidos profundos associadas a alterações neurológicas e vários graus de doença vascular periférica nos membros inferiores” <sup>2,7</sup>.

Essas lesões são uma complicação comum de longa data para os portadores de DM. Até 25% dos pacientes correm o risco de desenvolver úlceras do pé diabético ao longo de sua vida <sup>7,8</sup>.

As úlceras do pé diabético precedem mais de 80% das amputações não traumáticas dos membros inferiores <sup>9</sup>. O pé diabético é a causa mais comum de internações prolongadas, compreendendo 25% das admissões hospitalares e

acarretando custos elevados de até 28 mil dólares a cada admissão por ulceração nos Estados Unidos. Na Suécia são 18 mil dólares em casos sem amputação e 34 mil dólares naqueles com amputação<sup>9,10</sup>. No Brasil, são estimadas para uma população de 7,12 milhões de indivíduos com diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), 484.500 úlceras, 169.600 admissões hospitalares e 80.900 amputações, das quais 21.700 teriam como desfecho a morte <sup>2</sup>.

A abordagem do membro inferior do paciente diabético exige determinados cuidados gerais como controle da glicemia, hipertensão, obesidade, dislipidemia, tabagismo, atividade física, alimentação <sup>1,6</sup> que são preditivos para melhorar a qualidade de vida e as chances de recuperação. O exame clínico dos pés deve ser rígido e cauteloso, capaz de identificar as diversas alterações que elevam o risco de desenvolvimento de úlceras <sup>1,2,6,7</sup>.

As lesões do pé diabético frequentemente resultam de uma combinação entre dois ou mais fatores de risco, como resposta inflamatória alterada, deficiências da microcirculação cutânea ou estresse oxidativo <sup>11,12</sup>. É a interação de causas contributivas que leva o pé em risco à necrose tecidual e à formação de úlcera<sup>11,13</sup>. Assim, a neuropatia diabética periférica (fibras, sensitivas, motoras e/ou autonômicas afetadas) e angiopatia (isquemia vascular) são as patologias mais significativas no caminho da ulceração<sup>11,13</sup>.

A neuropatia diabética é responsável pelo início de 45% até 60% de feridas no pé diabético, enquanto o suprimento sanguíneo arterial diminuído, isquemia periférica, é a causa de lesões em 35% dos casos<sup>11,14</sup>.

Múltiplos fatores contribuem para a produção de neuropatia diabética, como concentração de glicose no sangue, anormalidades no metabolismo dos

ácidos graxos, lipídeos sanguíneos, permeabilidade e estrutura da bainha de mielina, fluxo axonal e macro e microangiopatia dos nervos periféricos<sup>13,14</sup>.

Uma revisão sistemática<sup>15</sup> revelou que ensaios clínicos realizados nos Estados Unidos mostraram que a maioria das lesões em pé diabético eram localizados nos dedos dos pés, antepé, mediopé, retropé e metatarso. Resultados da perda de sensibilidade, relacionada a neuropatia, aos fatores biomecânicos, que levam a deformidades que geram ou agravam as lesões devido a trauma repetitivo<sup>15</sup>.

As lesões do pé diabético apresentam cura lentificada ou têm grave progressão, exigindo amputações de alguns segmentos do pé<sup>11</sup>. Afirmam que as úlceras diabéticas e outros tipos de feridas crônicas não seguem um processo de cura habitual, sugerindo que podem ficar estagnadas em diferentes fases e, portanto, não conseguem cicatrizar adequadamente<sup>16</sup>.

A senescência celular é a parada de crescimento irreversível da célula, frequentemente associada à inflamação crônica causada pela diabetes, que ocorre em resposta a vários estressores celulares, como o estresse oxidativo, por exemplo<sup>17</sup>. Assim, as disfunções metabólicas observadas no diabetes, como hiperglicemia, alterações no metabolismo lipídico e desvios do eixo do hormônio do crescimento, podem promover a formação de células senescentes<sup>17</sup>.

Sendo um distúrbio metabólico que afeta gravemente o reparo de feridas<sup>12</sup>, os pacientes diabéticos, apresentam uma resposta tardia ao processo de cicatrização, com uma fase de proliferação prolongada e tardia na formação do tecido de granulação, um aumento da apoptose de fibroblastos, com baixa angiogênese e uma reepitelização defasada<sup>11</sup>.



A senescência celular pode levar a uma grande disfunção celular e tecidual, levando a uma resposta prejudicada da cicatrização da ferida<sup>17</sup>. Há um abrandamento do processo reparador, levando a uma falha no fechamento da úlcera, com conseqüente cronificação, isquemia local, aumento da carga bacteriana e do tecido necrótico<sup>11,12,17</sup>. Esse comprometimento prejudica a qualidade do tecido cicatricial diabético, apresentando claras deficiências, como diminuição da deposição de colágeno e alteração da epitelização<sup>12</sup>.

Compreender o insucesso do processo de cicatrização normal da ferida diabética é essencial para selecionar o tratamento<sup>16</sup>. Novas alternativas terapêuticas estão sob investigação. Curativos avançados, terapias à vácuo, terapia celular, dentre outros, surgem a cada dia como opção de tratamento para essas lesões<sup>12,15</sup>.

Pela complexidade de recuperação, em muitos casos os métodos de tratamento com curativos, habitualmente utilizados no tratamento de feridas, não são satisfatórios. A terapia com ozônio tem sido usada por muitos anos como um método auxiliar ao tratamento usual para úlceras nos pés em pacientes com DM<sup>18</sup>.

O ozônio (O<sub>3</sub>), gás descoberto pela comunidade médica em meados do século XIX, é uma molécula que consiste em três átomos de oxigênio em uma estrutura dinamicamente instável devido à presença de estados mesoméricos<sup>19</sup>. Seus efeitos são comprovados, consistentes e com efeitos colaterais mínimos<sup>19,20</sup>.

O mecanismo pelo qual o ozônio alcança a cura em feridas crônicas ainda não é conhecido<sup>21</sup>. Complicações diabéticas são atribuídas ao estresse oxidativo sistêmico<sup>19</sup>. Tem sido sugerido que o ozônio pode estar relacionado a fatores

de crescimento e que pode ativar o sistema antioxidante (rede complexa de metabólitos e enzimas antioxidantes que atuam em conjunto para prevenir danos oxidativos em componentes celulares, afetando o nível de glicemia) e ativa a superóxido dismutase, prevenindo o estresse oxidativo normalizando os níveis de peróxido orgânico<sup>19,21</sup>. Além disso, as propriedades antioxidantes do ozônio poderiam preservar as funções das células  $\beta$  e reduzir a hiperglicemia<sup>21</sup>.

Estudos sugerem que a aplicação da terapia com O<sub>3</sub>, além de seus efeitos positivos no processo de cicatrização de feridas crônicas, pode melhorar significativamente e aumentar a qualidade de vida dos pacientes<sup>22</sup>.

A atividade antimicrobiana é caracterizada pela inativação de bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários, onde o ozônio interrompe a integridade da parede celular bacteriana através da oxidação dos fosfolipídios e lipoproteínas. Contra os vírus, o O<sub>3</sub> danifica o capsídeo viral e perturba o ciclo reprodutivo ao interromper o contato vírus-célula com a peroxidação. Agindo nos fungos, o ozônio inibe o crescimento celular em certos estágios<sup>19</sup>.

Um estudo demonstrou que a água ozonizada, juntamente com óleos ozonizados, pode ser usada como um estimulante desinfetante e cicatrizante<sup>18,20,23</sup>. Com base no tipo de úlceras nos pés, a água ozonizada e diferentes gradações de óleos vegetais ozonizados (por exemplo, girassol ou azeite de oliva ozonizado), são usados topicamente até a recuperação completa<sup>18,20,23</sup>. Nenhum efeito colateral foi observado nos estudos realizados<sup>23</sup>.

O ozônio pode ser eficaz através do pré-condicionamento oxidativo e estimulação de sistemas antioxidantes endógenos, prevenindo o dano induzido por Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)<sup>23</sup>. Assim, a estimulação enzimática antioxidante, regulação do fator de crescimento, aumento da infusão sanguínea

local e atividade antibacteriana são os papéis benéficos da terapia com O<sub>3</sub> na melhora da ferida crônica<sup>19,22</sup>.

Atualmente, existem poucas revisões sistemáticas que avaliem os efeitos da ozonioterapia para úlceras nos pés em pessoas com DM. Considerando a sugestão de um tratamento útil em feridas diabéticas e a necessidade de embasamento nas condutas clínicas, o objetivo deste estudo é a realização de uma revisão sistemática com metanálise para analisar as evidências científicas disponíveis na literatura sobre o uso da ozonioterapia para estímulo da cicatrização de úlceras em pé diabético.

## **2. OBJETIVO**

Realizar revisão sistemática com metanálise sobre o nível de evidência da ozonioterapia no tratamento de úlceras nos pés de pacientes com Diabetes mellitus, analisando os desfechos de número de úlceras curadas, redução da área da úlcera, tempo de internação, alterações na glicemia, no sistema antioxidante e amputações.

### **3. MÉTODO**

Trata-se de uma revisão sistemática com metanálise sobre o uso da ozonioterapia no tratamento do pé diabético, utilizando o Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA)<sup>24</sup> como um checklist para nortear a redação da revisão sistemática.

#### **CRITÉRIOS DE SELEÇÃO**

Foram estabelecidos os seguintes critérios para a inclusão dos estudos: Ensaio clínico randomizado (ECR) foram considerados para inclusão, independentemente do idioma. Que utilizassem a ozonioterapia no tratamento das feridas em pé diabético; indexados nas bases de dados Pubmed, Embase e Web of Science até janeiro de 2019.

Os critérios de exclusão são: Artigos, editoriais e cartas publicadas na forma de resumos; relatos de caso, séries de caso, estudos transversais, observacionais e experimentais (em animais).

#### **TIPOS DE PARTICIPANTES**

Os estudos selecionados incluíram indivíduos humanos de qualquer idade com DM tipo 1 ou tipo 2 e com úlcera ativa no pé.

## **TIPOS DE INTERVENÇÕES**

Grupo Intervenção: Receberam a Ozonioterapia como proposta principal para o tratamento das úlceras do pé diabético, em forma de gás, água ou na forma oleosa.

Grupo Controle: Grupo com qualquer outra intervenção usada para promover a cura, como antibióticos, agentes tópicos ou cuidados habituais.

## **TIPOS DE DESFECHOS**

Desfechos primários

1. Número de úlceras curadas;
2. Redução da área da úlcera;
3. Tempo de internação;

Desfecho secundário

1. Avaliação da glicemia;
2. Análise de Sistema antioxidante;
3. Amputações;

## **ESTRATÉGIA DE BUSCA**

Para localização dos estudos foram feitas buscas de ensaios clínicos publicados e indexados nas bases de dados Pubmed, Embase e Web of Science sobre a prática da ozonioterapia no tratamento de feridas em pé diabético até

janeiro de 2019. Não foi estabelecido uma data limite inicial em razão do baixo número de publicações sobre o assunto.

Os termos de busca (mesh terms) foram definidos utilizando a estratégia PICO<sup>25</sup>. Além dos mesh terms, foram utilizados todos os entry terms encontrados durante a busca dos meshes, assim temos:

**População (P):** Diabetic foot OR Diabetic foot [Mesh] OR Foot Ulcer OR Diabetic

AND

**Intervenção (I):** Ozone OR Ozone [Mesh] OR Ozone therapy OR Oxygen

**Comparison (C):** item não pesquisado

**Resultado - outcome (O):** item não pesquisado

## SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Inicialmente foram lidos os títulos e resumos, e triados apenas ensaios clínicos que avaliassem o uso da ozonioterapia em pé diabético. Posteriormente, todos os estudos pré-triados foram lidos na íntegra e selecionados para compor a amostra final somente aqueles que preencheram os critérios de inclusão e exclusão. Dois revisores independentes (um cirurgião plástico e um enfermeiro) foram responsáveis por coletar os dados relevantes e analisar os riscos de viés de cada estudo. Em caso de empate, um terceiro indivíduo (estomaterapeuta) era solicitado para dirimir o impasse.

## **COLETA DE DADOS**

Os revisores extraíram os seguintes dados dos artigos: Autor, ano, tipo de estudo, tamanho da amostra, idade média, estágio da diabetes (Classificação de Wagner), tamanho e duração das úlceras, tempo da diabetes melitus, tempo de seguimento do estudo, tratamento utilizado no grupo controle e intervenção, desfechos avaliados, tempo de internação, número de úlceras curadas, redução da área da úlcera, dados laboratoriais da análise do sistema antioxidante e glicemia e número de amputações.

## **AVALIAÇÃO DE RISCO DE VIÉS DA AMOSTRA**

A avaliação do risco de viés dos ensaios clínicos randomizados foi realizada utilizando-se critérios do Manual da Cochrane para julgamentos do risco de viés. Esta ferramenta verifica seis domínios de risco de viés passíveis de acontecer em ensaios clínicos randomizados: viés de seleção, de performance, de detecção, de atrito, de comunicação e outros vieses. Cada artigo foi avaliado segundo estes domínios e ao fim gerou-se um gráfico de análise geral da amostra.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para realização da análise estatística foi utilizado o programa Review Manager 5.3 para construção dos gráficos de floresta.



## 4. RESULTADOS

### EFEITO DA OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE ÚLCERAS EM MEMBROS INFERIORES DE PACIENTES DIABÉTICOS: REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

#### RESUMO

**Introdução:** As úlceras diabéticas não seguem um processo de cura habitual, podendo ficar estagnadas em diferentes fases e, portanto, não conseguem cicatrizar adequadamente. Estudos mostram que a ozonioterapia estimula a ação enzimática antioxidante, regula os fatores de crescimento, aumenta a infusão sanguínea local e tem atividade antibacteriana. **Objetivo:** Analisar o nível de evidência da ozonioterapia no tratamento de úlceras nos pés de pacientes com Diabetes mellitus. **Método:** Foi realizada uma Revisão sistemática com metanálise, com buscas de ensaios clínicos publicados e indexados nas bases de dados Pubmed, Embase e Web of Science até janeiro de 2019 com a finalidade de analisar os desfechos de número de úlceras curadas, redução da área da úlcera, tempo de internação, alterações na glicemia, no sistema antioxidante e amputações. **Resultados:** Foram encontrados 61 estudos, após a análise com os critérios de elegibilidade, apenas 06 foram eleitos para amostra final. Um total de 496 pacientes foram avaliados nos estudos selecionados distribuídos em grupo controle ou intervenção. Os estudos mostraram maior taxa de cicatrização (úlceras curadas), menor tempo de internação hospitalar, aumento da catalase no desempenho antioxidante, redução da glicemia e menores taxas de amputação a favor da terapia com ozônio **Conclusões:** A aplicação do ozônio como tratamento para úlceras do pé diabético, sugere bom potencial para indicação na prática clínica, em comparação com tratamentos convencionais.

**Descritores:** Pé diabético, Ozônio, Desbridamento, Úlcera, Cicatrização.

## INTRODUÇÃO

O pé diabético decorre das diversas alterações e complicações ocorridas no membro inferior do paciente com Diabetes Mellitus (DM)<sup>1</sup>. Costuma evoluir com a destruição de tecidos profundos decorrentes da isquemia, a neuropatia e a infecção<sup>1,2</sup>. Até 25% dos pacientes diabéticos correm o risco de desenvolver úlceras do pé diabético (UPD) ao longo de sua vida<sup>3</sup>.

Estudos evidenciam que as lesões do pé diabético apresentam cicatrização lentificada e frequentemente, acarretam amputações de alguns segmentos do pé<sup>4</sup>. Disfunções metabólicas observadas no diabetes, como hiperglicemia, alterações no metabolismo lipídico e desvios do eixo do hormônio do crescimento, aumentam o estresse oxidativo, causando a inflamação crônica que danifica as células, promovendo a formação de células senescentes<sup>5</sup>. Assim, há uma grande disfunção celular e tecidual, resultando em prejuízo cicatricial da ferida<sup>5</sup>.

Com o abrandamento do processo reparador, haverá uma falha no fechamento da úlcera, com conseqüente cronificação, isquemia local, aumento da carga bacteriana e do tecido necrótico<sup>4-6</sup>. Sendo um distúrbio metabólico que afeta gravemente o reparo das feridas<sup>6</sup>, os pacientes diabéticos, apresentam uma fase de proliferação prolongada e tardia na formação do tecido de granulação, um aumento da apoptose de fibroblastos, com baixa angiogênese e um prejuízo na reepitelização<sup>4</sup>. O aumento dos níveis de citocinas inflamatórias cria um ambiente molecular alterado, e este estado pró-inflamatório prejudica ainda mais a cicatrização das lesões<sup>1,4,6</sup>.

Curativos avançados, terapias à vácuo, terapia celular, dentre outros, surgem a cada dia como opção de tratamento destas lesões e novas alternativas terapêuticas estão sob investigação<sup>6,7</sup>. Qualquer tratamento capaz de estabilizar o metabolismo do oxigênio e equilibrar o estresse oxidativo juntamente com propriedades antibacterianas pode acelerar o processo cicatricial de cura<sup>8</sup>.

A terapia com ozônio (O<sub>3</sub>) tem sido usada por muitos anos como um método auxiliar ao tratamento usual para úlceras nos pés em pacientes com DM<sup>9</sup>. Estudos sugerem que a aplicação da terapia com O<sub>3</sub>, além de seus efeitos positivos no processo de cicatrização de feridas crônicas, pode melhorar significativamente a lesão e aumentar a qualidade de vida dos pacientes<sup>10</sup>. Apresentando estimulação enzimática antioxidante, regulação do fator de crescimento, aumento da infusão sanguínea local e atividade antibacteriana, a ozonioterapia vem sendo estudada para avaliar sua efetividade voltada às feridas crônicas<sup>10,11</sup>.

Com o intuito de fortalecer as evidências apresentadas no cenário atual, o objetivo deste estudo é a realização de uma revisão sistemática com metanálise para analisar as evidências científicas disponíveis na literatura sobre o uso da ozonioterapia para estímulo da cicatrização da úlcera em pé diabético.

## **MÉTODOS**

Trata-se de uma revisão sistemática com metanálise sobre o uso da ozonioterapia no tratamento do pé diabético, utilizando o Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA)<sup>12</sup> como um checklist para nortear a redação da revisão sistemática.

## **Crítérios de seleção**

Foram estabelecidos os seguintes critérios para inclusão dos estudos: Ensaio clínicos randomizados (ECR) foram considerados para inclusão, independentemente do idioma. Que utilizassem a ozonioterapia no tratamento das feridas em pé diabético; indexados nas bases de dados Pubmed, Embase e Web of Science até janeiro de 2019.

Os critérios de exclusão são: Artigos, editoriais e cartas publicadas na forma de resumos; relatos de caso, séries de caso, estudos transversais, observacionais e experimentais (em animais).

## **Tipos de participantes**

Os estudos selecionados incluíram indivíduos humanos de qualquer idade com DM tipo 1 ou tipo 2 e com úlcera ativa no pé.

## **Tipos de intervenções**

Grupo Intervenção: Receberam a Ozonioterapia como proposta principal para o tratamento das úlceras do pé diabético, em forma de gás, água ou na forma oleosa.

Grupo Controle: Grupo com qualquer outra intervenção usada para promover a cura, como antibióticos, agentes tópicos ou cuidados habituais.

## **Tipos de desfechos**

### Desfechos primários

1. Número de úlceras curadas;
2. Redução da área da úlcera;
3. Tempo de internação;

### Desfecho secundário

1. Análise de Sistema antioxidante;
2. Avaliação da glicemia;
3. Amputações;

### **Estratégia de busca**

Para localização dos estudos foram feitas buscas de ensaios clínicos publicados e indexados nas bases de dados Pubmed, Embase e Web of Science sobre a prática da ozonioterapia no tratamento de feridas em pé diabético até janeiro de 2019. Não foi estabelecido uma data limite inicial em razão do baixo número de publicações sobre o assunto.

Os termos de busca (mesh terms) foram definidos utilizando a estratégia PICO<sup>13</sup>. Além dos mesh terms, foram utilizados todos os entry terms encontrados durante a busca dos meshs, assim temos:

**População (P):** Diabetic foot OR Diabetic foot [Mesh] OR Foot Ulcer OR Diabetic

AND

**Intervenção (I):** Ozone OR Ozone [Mesh] OR Ozone therapy OR Oxygen

**Comparison (C):** item não pesquisado

**Resultado - outcome (O):** item não pesquisado

### **Seleção dos estudos**

Inicialmente foram lidos os títulos e resumos, e triados apenas ensaios clínicos que avaliassem o uso da ozonioterapia em pé diabético. Posteriormente, todos os estudos pré-triados foram lidos na íntegra e selecionados para compor a amostra final somente aqueles que preencheram os critérios de inclusão e exclusão. Dois revisores independentes (um cirurgião plástico e um enfermeiro) foram responsáveis por coletar os dados relevantes e analisar os riscos de viés de cada estudo. Em caso de empate, um terceiro indivíduo (estomaterapeuta) era solicitado para dirimir o impasse.

### **Coleta de dados**

Os revisores extraíram os seguintes dados dos artigos: Autor, ano, tipo de estudo, tamanho da amostra, idade média, estágio da diabetes (Classificação de Wagner), tamanho e duração das úlceras, tempo da diabetes melitus, tempo de seguimento do estudo, tratamento utilizado no grupo controle e intervenção, desfechos avaliados, tempo de internação, número de úlceras curadas, redução da área da úlcera, dados laboratoriais da análise do sistema antioxidante e da glicemia e taxa de amputações.

### **Avaliação de risco de viés da amostra**

A avaliação do risco de viés dos ensaios clínicos randomizados foi realizada utilizando-se critérios do Manual da Cochrane para julgamentos do risco de viés. Esta ferramenta verifica seis domínios de risco de viés passíveis de acontecer em ensaios clínicos randomizados: viés de seleção, de performance, de detecção, de atrito, de comunicação e outros vieses. Cada artigo foi avaliado segundo estes domínios e ao fim gerou-se um gráfico de análise geral da amostra.

### **Análise estatística**

Para realização da análise estatística foi utilizado o programa Review Manager 5.3 para construção dos gráficos de floresta.

## **RESULTADOS**

Inicialmente, foram encontrados 61 estudos, porém com a leitura de títulos, resumos e retirada de duplicatas, restaram 12 trabalhos. Após a leitura integral do conteúdo dos artigos, percebeu-se que apenas 06 atendiam aos critérios de elegibilidade (Figura 1).

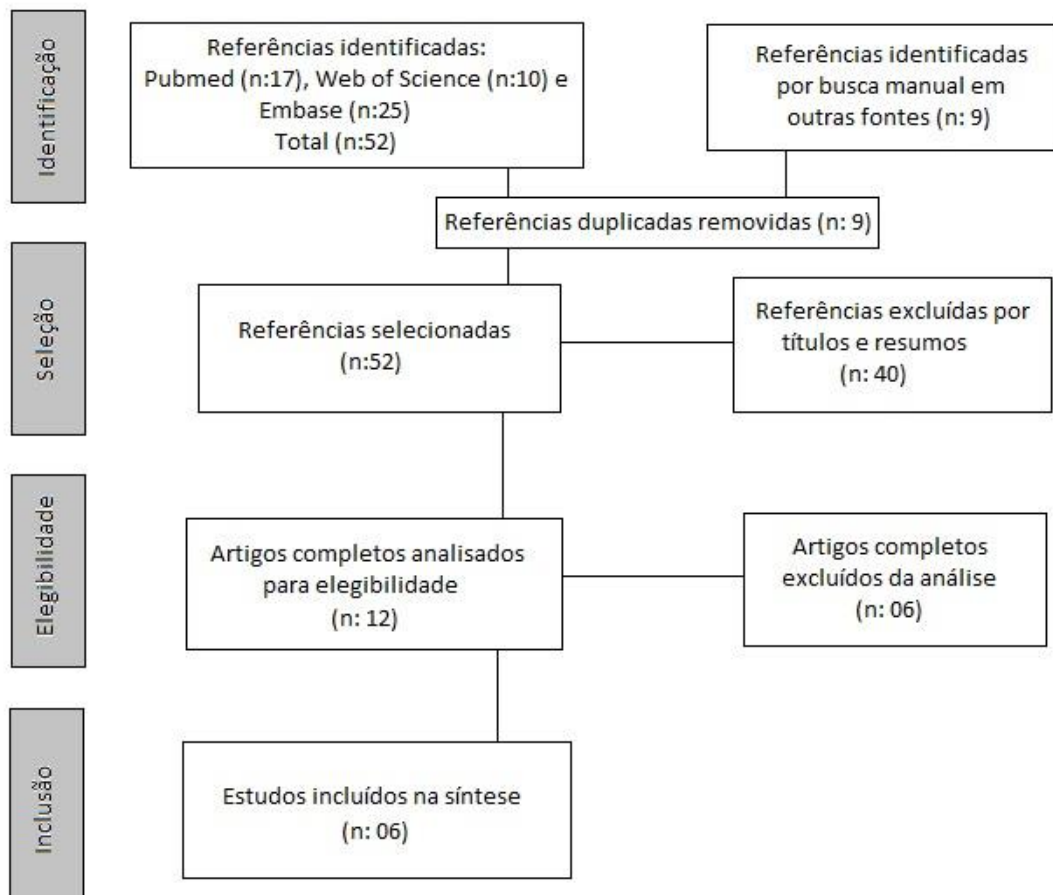


Figura 1. Fluxograma da estratégia de busca para seleção dos artigos estudados.

Um total de 496 pacientes foram avaliados nos estudos selecionados distribuídos em grupo controle ou intervenção. Na tabela 1, são apresentadas as características clínico epidemiológicas dos participantes incluídos nos diferentes ensaios clínicos selecionados.



**Tabela 1-** Características dos pacientes dos estudos selecionados

Autor/Ano	Tamanho do estudo	Idade média (anos)	Estágio (Classificação de Wagner)	Tamanho das úlceras (cm <sup>2</sup> )	Duração da DM (anos)	Duração das Úlceras (dias)
Izadi M et al. 2019 <sup>14</sup>	200 pacientes	C- 53,5 ± 10,212 I-59,03 ± 12,593	Estágios 1-4	C- 12,72 ±0,911 I-13,41 ±14.092	-	-
Teuvov AA et al. 2017 <sup>15</sup> .	37 pacientes	21 – 40: C-12% I-0% 41 – 60: C-12% I-25% >60: C-76% I-75%	Estágios 3 -5	-	-	-
Rosul MV et al. 2016 <sup>16</sup> .	47 pacientes	Média: 60,06 ± 1,28 anos	Estágios 1 e 2	-	-	-
Zhang J et al. 2014 <sup>17</sup> .	50 pacientes	C- 61.12 (10.90) I- 59.72 (12.2)	Estágios 2, 3 ou 4	C- 10.82 ± 0.93 I – 11.74 ± 0.72	C- 10.24 ± 5.47 I- 8.64 ± 5.35	C- 46.60 ± 10.79 I- 45.04 ± 8.59
Wainstein J et al. 2011 <sup>18</sup> .	61 pacientes	C- 62.6 (9.5) I- 62.6 (10.2)	Estágio 2 ou 3 ou úlcera estágio 4 após desbridamento de pelo menos 8 semanas	C- 3.5 – 3.8 I- 4.9 – 4.4	C- 16.4 ± 11.0 I- 15.2 ± 9.7	-
Martínez-Sánchez G et al. 2005 <sup>19</sup> .	101 pacientes	20 – 40: C-14% I-9% 40 – 60: C-40% I-32% >60: C-44% I-57%	-	C- 54.84 - 0.39 I- 57.97 – 0.52	C- 18 ± 8 I- 17 ± 11	-

**Legenda: C- Controle; I- Intervenção; DM- Diabetes Mellitus**

Na tabela 2 foram agrupadas as informações referentes a metodologia aplicada a cada estudo. Ao diferenciar os grupos analisados, percebe-se que 248 participantes foram submetidos à ozonioterapia, seja ela de forma sistêmica ou local, num tempo de seguimento que variou de 14 aos 180 dias. Os estudos usaram diversas intervenções no grupo controle que também foram aplicadas ao grupo intervenção em associação ao uso do ozônio. A maior parte dos trabalhos utilizou terapia com curativos para debridamento e manutenção de meio úmido da ferida, apenas um trial<sup>19</sup> fez uso de antibiótico tópico no grupo controle.

**Tabela 2-** Características metodológicas dos estudos selecionados.

<b>Autor e Ano</b>	<b>Tamanho da intervenção</b>	<b>Tempo de seguimento</b>	<b>Controle</b>	<b>Intervenção</b>	<b>Desfechos avaliados</b>
Izadi M et al. 2019 <sup>14</sup>	C-100, I- 100	180 dias	Administração de antibióticos apropriados, curativos estéreis regulares e uso de desbridamento cirúrgico.	Administração de antibióticos apropriados, curativos estéreis regulares e uso de desbridamento cirúrgico + Ozonioterapia local e sistêmica.	Cicatrização, taxa de amputação, proteína C reativa, taxa de hemossedimentação, glicemia
Teuvov AA et al. 2017 <sup>15</sup> .	C-20, I-17	14 dias	Desbridamento cirúrgico + curativos para manutenção da umidade da ferida	Desbridamento cirúrgico + curativos para manutenção da umidade da ferida + Ozonioterapia sistêmica e regional.	Alteração citológica e bacteriológica da ferida; Tempo de internação
Rosul MV, et al. 2016 <sup>16</sup> .	C-24, I-23	35 dias	Uso diário de antissépticos na ferida	Antisséptico na ferida + Ozonioterapia sistêmica e regional.	Redução do inchaço e hiperemia; Tecido necrótico; Emergência de granulação; Epitelização marginal; sistema antioxidante; Tempo de internação.
Zhang J et al. 2014 <sup>17</sup> .	C-25, I-25	20 dias	Desbridamento e curativos para manutenção da umidade da ferida.	Desbridamento e curativos para manutenção da umidade da ferida + Ozonioterapia local.	Número de úlceras curadas; Redução na área da úlcera; Produção de colágeno, VEGF, TGF-B e PDGF.

Wainstein J et al. 2011 <sup>18</sup> .	C-30, I-31	168 dias	Curativos para manutenção da umidade da ferida e simulação de Ozonioterapia com dispositivo no modo inativo.	Curativo para manutenção de meio úmido + Ozonioterapia local.	Número de úlceras curadas; Redução na área da úlcera; Eventos adversos; Amputação.
Martínez-Sánchez G et al. 2005 <sup>19</sup> .	C-49, I-52	20 dias	Antibioticoterapia tópico e sistêmico.	Ozonioterapia sistêmica e regional.	Medição da área e perímetro das lesões; Avaliação qualitativa; Tempo de internação; glicemia; sistema antioxidante; ulceras curadas.

**Legenda: C- Controle; I- Intervenção.**

## Avaliação de Risco de Viés ensaios clínicos randomizados

Na figura 2, podemos observar as avaliações consensuais que cada estudo recebeu dos pesquisadores nos diferentes domínios avaliados. A avaliação de risco de viés dos ensaios randomizados evidenciou que os estudos selecionados apresentavam risco considerável para viés em todos os domínios analisados (Figura 2 e 3).

	Random sequence generation (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Izadi M et al 2019	-	-	-	-	?	-	?
Martínez-Sánchez G et al. 2005	?	?	-	-	+	?	?
Teuvov et al. 2017	-	+	-	-	?	?	?
Wainstein J et al. 2011	?	?	+	+	-	?	+
Zhang J, 2014	?	?	-	-	+	?	?

Figura 2: Resumo da qualidade do risco de viés: julgamento dos autores a respeito de cada item da qualidade do viés incluso no estudo.

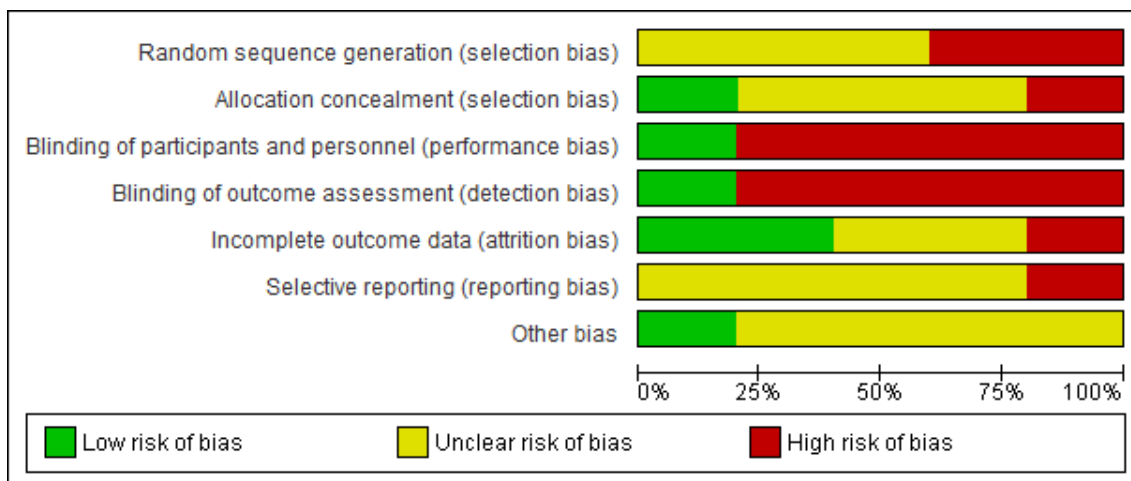


Figura 3. Gráfico da qualidade do risco de viés: julgamento da revisão dos autores a respeito de cada item disposto através porcentagem dos estudos incluídos.

### Análise de desfechos e metanálise

Percebe-se uma variedade nos desfechos avaliados, havendo uma disparidade nos desfechos apresentados, que vão desde a apresentação da lesão (quantidade e epitelação) à avaliação do sistema antioxidante e demais achados laboratoriais das úlceras. Os desfechos em comum encontrados nos estudos analisados podem ser observados na Tabela 3.

**Tabela 3-** Dados referentes aos desfechos avaliados nesta revisão sistemática.

Autor/Ano	Número de Úlceras curadas	Redução da área da úlcera (cm <sup>2</sup> )	Tempo de internação	Amputação
Izadi M et al. 2019 <sup>14</sup>	C- 55/100 I-81/100	-	-	C- 27/100 I- 19/100
Teuvov AA et al. 2017 <sup>15</sup> .	-	-	C- 31 I- 24	-
Rosul MV, et al. 2016 <sup>16</sup> .	-	-	C- 23.42 ± 0.45 I- 17.09 ± 0.27	-
Zhang J et al. 2014 <sup>17</sup> .	C- 3/25 I- 6/25	C- 3.19 ± 0.65 I- 6.84 ± 0.62	-	-
Wainstein J et al. 2011 <sup>18</sup> .	C- 10/30 I- 13/31	C- 2.1 ± 1.8 I- 2.9 ± 4.8	-	C- 0/29 I- 1/32
Martínez-Sánchez G et al. 2005 <sup>19</sup> .	C- 34/49 I- 40/51	C- 14.12 ± 0.14 I- 34.66 ± 0.21	C- 34 ± 18 I- 26 ± 13	C- 7/49 I- 3/51

Legenda: C- Controle; I- Intervenção;

### Desfecho: Cicatrização (Número de úlceras curadas)

O desfecho cicatrização foi avaliado pelo número de pacientes que cicatrizaram em relação ao total de pacientes tratados (número de úlceras curadas) tendo comportamento dicotômico, ou seja, a lesão havia cicatrizado ou não. Quatro estudos<sup>14,17-19</sup> apresentaram por completo o resultados das úlceras curadas (Tabela 3). Na figura 4, podemos observar claramente que existe um resultado positivo para o grupo tratado com ozonioterapia, com o diamante totalmente posicionado no lado intervenção.

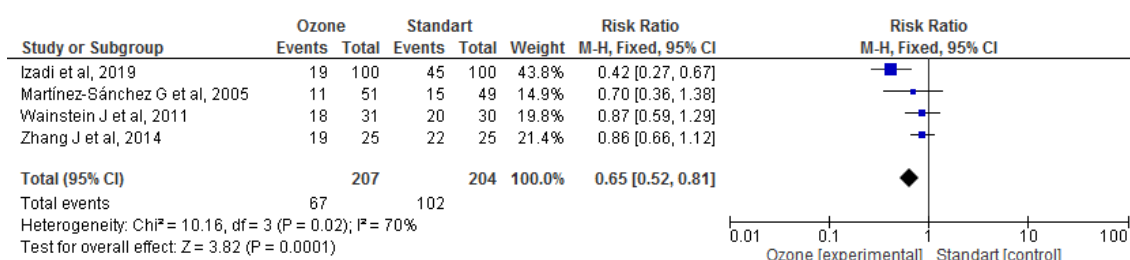


Figura 4: Gráfico de floresta sobre a Número de úlceras curadas.

### Desfecho: Redução da área da úlcera

Para avaliação da redução da área da ferida, por se tratar de uma variável contínua, torna-se obrigatória a apresentação da média de redução e seu desvio padrão para avaliação por metanálise. Dois artigos<sup>17,19</sup> traziam os dados completos (Tabela 3). Os dados completos (desvio padrão) do estudo de Wainstein J. et al<sup>18</sup> só puderam ser obtidos por estarem publicados em uma revisão prévia produzida pelo grupo da Cochrane<sup>9</sup> (Tabela 3).

Na figura 5, podemos observar no gráfico de floresta que o diamante se posiciona sobre o eixo vertical, indicando não haver diferença entre a intervenção e o controle na redução da área da ferida.

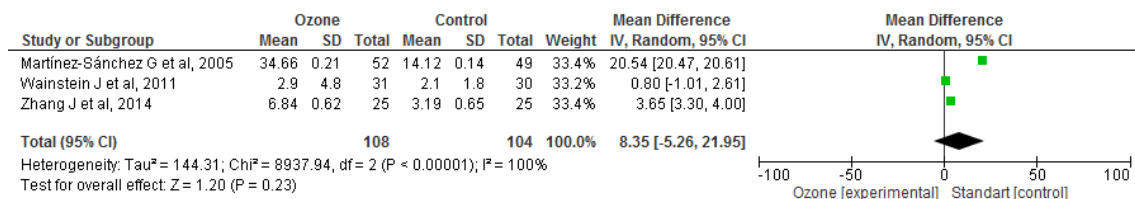


Figura 5: Gráfico de floresta sobre a Redução da área da úlcera.

### Desfecho: Tempo de internação

Três artigos<sup>15,16,19</sup> avaliaram o desfecho tempo de internação, porém por se tratar uma variável contínua, seria necessário o valor da média e do desvio padrão de



todos os estudos para inclusão na metanálise (Tabela 3). Um estudo<sup>15</sup> não apresentou o valor do desvio padrão da variável medida, e teve que ser excluído. Na figura 6, observamos que existe uma tendência de menor hospitalização para os pacientes tratados com ozonioterapia.

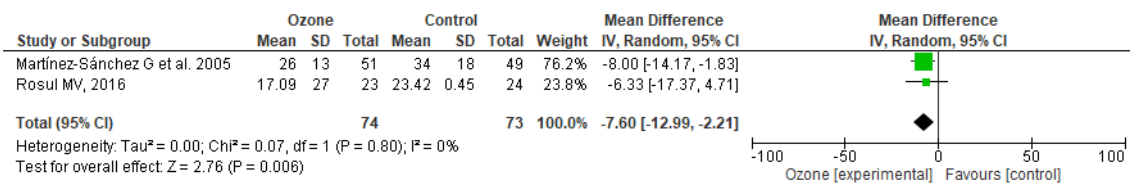


Figura 6: Gráfico de floresta sobre o Tempo de Internação.

## Desfecho – Sistema Antioxidante

Dois estudos<sup>16,19</sup> trouxeram em seus resultados a análise do Sistema antioxidante, entretanto vale a pena salientar que os estudos utilizaram metodologias e unidades de medida diferentes para avaliar os mesmos elementos como a Catalase e o Malondialdeído (MDA), impedindo a realização de algum tipo de metanálise deste desfecho.

Quanto ao MDA, podemos observar em ambos os estudos selecionados resultados bastante semelhantes no início e no fim nos valores de MDA dos pacientes tratados com ozonioterapia. No grupo controle, também não houve grande oscilação nos valores dosados de MDA (Tabela 4).

Já em relação a Catalase, foi evidenciado um resultado mais interessante. Ambos os autores identificaram que os pacientes tratados no grupo intervenção (Ozonio),

tiveram um aumento dos níveis de catalase após aplicação da terapia proposta. Enquanto isso, no grupo controle o resultado da dosagem de catalase permaneceu praticamente inalterado no trabalho de Rosul MV, et al. 2016<sup>16</sup>, enquanto, na dosagem de Martínez-Sánchez G et al. 2005<sup>19</sup> ocorreu uma pequena queda na ação da catalase (Tabela 4).

**Tabela 4-** Dados referentes aos achados da Análise do Sistema Antioxidante.

	Malondialdeído - MDA	Catalase
Rosul MV, et al. 2016 <sup>16</sup> .	Início: C- $4.72 \pm 0.40$ ; I- $4.73 \pm 0.39$ (nmol/L)	Início: C- $18.47 \pm 0.89$ ; I- $18.64 \pm 0.73$ (mcat/L)
	Fim: C- $4.63 \pm 0.39$ ; I- $4.01 \pm 0.31$ (nmol/L)	Fim: C- $18.98 \pm 0.67$ I- $21.89 \pm 0.68$ (mcat/L)
Martínez-Sánchez G et al. 2005 <sup>19</sup> .	Início: C- $8.78 \pm 0.85$ ; I- $9.04 \pm 0.44$ ( $\mu$ M)	Início: C- $2880 \pm 250$ ; I- $2112 \pm 210$ (U/ml/min)
	Fim: C- $10.12 \pm 0.68$ ; I- $9.92 \pm 0.94$ ( $\mu$ M)	Fim: C- $2370 \pm 247$ ; I- $3101 \pm 290$ (U/ml/min)

#### **Desfecho: Glicemia**

Três artigos<sup>14,17,19</sup> descreveram sobre a importância da monitorização glicêmica dos pacientes em tratamento das úlceras do pé diabético, correlacionando-as com o processo cicatricial. Porém, não foi possível fazer uma metanálise dos achados, porque cada pesquisa descreve essa análise de uma maneira diferente.

Izadi et al. 2019<sup>14</sup> evidencia sobre a importância de se monitorar o comportamento glicêmico durante o acompanhamentos dos pacientes em tratamento das lesões do pé diabético. Os autores apresentaram uma análise da Glicemia em

Jejum, pré e pós tratamento. O grupo controle inicia o tratamento com o valor de  $166,01 \pm 46,01$  e tem o valor após tratamento numa média de  $188,01 \pm 46,02$ . Já o grupo tratado com ozonioterapia inicia o tratamento com o valor da Glicemia em jejum de  $178,36 \pm 80,314$  e ao final do tratamento, os participantes desse grupo apresentam uma média de  $135,58 \pm 44,151$ .

Já Martínez-Sánchez et al<sup>19</sup>, mostra em um gráfico o comportamento glicêmico dos pacientes tratados nos dois grupos, em que começam a pesquisa com uma concentração de glicemia média de  $10,11 \pm 4,20$  mM ( $182.16$  mg/dl). Após o tratamento (20 dias) o estudo conclui que os participantes do grupo tratado com ozônio (intervenção) tiveram uma concentração de glicose no sangue significativamente menor ( $109.9$  mg/dl) do que o grupo tratado com antibioticoterapia (controle), onde a concentração de glicose não havia mudado.

Percebe-se nessas duas pesquisas, que houve uma diminuição favorável dos níveis de glicose no sangue que beneficiou os participantes do grupo tratado com ozônio. Enquanto que na pesquisa de Izadi et al<sup>14</sup> houve um decréscimo de  $42.78$  mg/dl na média de todos os pacientes do grupo intervenção, no estudo de Martínez-Sánchez et al<sup>19</sup> essa redução obteve 80% de decréscimo ao fim do tratamento, nos pacientes tratados com ozônio.

Já nos grupos controle, observa-se que os valores não regrediram, chegando a aumentar a média do nível de glicose no sangue dos pacientes do grupo controle do estudo de Izadi et al<sup>14</sup>.

### **Desfecho – Amputação**

A taxa de amputação foi relatada por três artigos<sup>14,18,19</sup>. Para a realização dessa metanálise, foi necessário refazer os cálculos das porcentagens de amputações (%) referentes a cada estágio das lesões pela Classificação de Wagner, indicado no texto de um artigo (Izadi et al<sup>14</sup>). O valor apresentado no resultado da pesquisa, indicava que 57% dos pacientes do grupo controle haviam sofrido amputações. Porém, ao refazer os cálculos baseado na Figura 1 que trazia a “Porcentagem de amputação em diferentes graus de ferida”, esse valor se retifica para 27%. Foi tentado contato com o autor correspondente, sem retorno até o momento.

Nessa metanálise, observamos o desvio padrão com tendência favorável ao grupo controle (tratamento convencional), inferindo o maior número de amputações a nesse grupo.

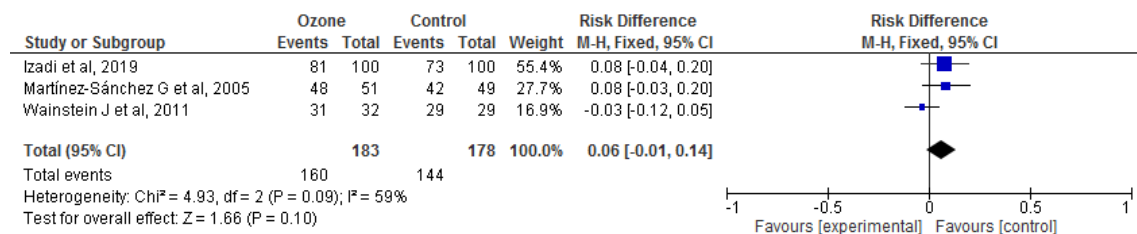


Figura 7: Gráfico de floresta sobre a taxa de amputação.

## DISCUSSÃO

A ozonioterapia trata-se de uma terapia bastante antiga, sendo usada desde meados do século XIX. Recentemente, alguns estudos sugerem seu uso para tratamento das UPDs<sup>20</sup>. Porém, vale salientar que ainda é pequeno o número de publicações sobre o assunto, principalmente do tipo ensaios clínicos. Este fato poder ser evidenciado pelo pequeno número de artigos (6) selecionados.

A ulceração do pé diabético é uma complicação grave do DM em todo o mundo e a causa mais comum de hospitalização em pacientes diabéticos<sup>20,21</sup>. A hiperglicemia provoca alterações no processo de resposta inflamatória e de cicatrização das UPD<sup>6</sup>.

Alguns fatores de riscos são conhecidos por facilitar a formação de ulceração do pé diabético como a idade avançada e a duração prolongada da DM<sup>21</sup>. Nesta revisão, a maior parte dos participantes tinha mais de 60 anos e uma média de convivência com a doença superior a 8 anos.

Ainda existem muitos questionamentos quanto a dose e forma de administração do ozônio no tratamento de lesões crônicas. Previamente ao uso em humanos, algumas pesquisas experimentais avaliaram a toxicidade do ozônio, tempo de exposição e concentração de O<sub>3</sub> capaz de estimular a cicatrização de feridas<sup>22</sup>, entretanto não existem respostas definitivas para estas questões. Por isso, nos estudos selecionados observamos que alguns autores preferem a administração apenas local de O<sub>3</sub>, enquanto outros associam seu uso sistêmico. Em relação aos controles utilizados, a maioria utiliza o desbridamento cirúrgico da ferida, curativos que mantêm o leito úmido e antibioticoterapia sistêmica. Apenas Martínez-Sánchez et al<sup>19</sup> apresentam uma variação no grupo controle escolhido, pois utilizam também antibióticos tópicos para tratamento das lesões.

Sabe-se que a cronicidade desse tipo de úlcera ocorre pela associação de alguns fatores como: a secreção inadequada de proteínas da matriz extracelular, a desregulação da atividade de macrófagos, a proliferação e aumento da apoptose de fibroblastos cutâneos e o comprometimento da angiogênese e reepitelização<sup>6</sup>. Em um paciente diabético com glicose sanguínea alterada, o dano mitocondrial acomete as células, causando a apoptose e prejudicando a cicatrização<sup>10</sup>. Além disso, hiperglicemia provoca redução do nível de antioxidantes e aumento da produção de radicais livres; com conseqüente dano vascular e necrose tecidual. O estresse oxidativo elevado e a redução de antioxidantes são mecanismos fundamentais para piora das úlceras em diabéticos<sup>8</sup>. Diante destes argumentos, consideramos essencial para esta revisão avaliar a ozonioterapia em três aspectos fundamentais que se inter-relacionam: estímulo da cicatrização das feridas, controle glicêmico e alterações no sistema oxidante.

O mecanismo de ação do ozônio na cura em feridas crônicas ainda não é completamente conhecido<sup>22</sup>. Em recente revisão publicada<sup>9</sup>, os autores optaram por analisar separadamente os trabalhos que utilizaram tratamento convencional daquele que utilizou como controle antibioticoterapia tópica<sup>16</sup>. Na primeira situação, observou-se vantagem pequena para ozonioterapia, já que o diamante embora toca-se o eixo vertical ficava totalmente posicionado no lado favorável à intervenção. Na segunda situação, não houve diferença entre os tratamentos comparados. Nesta revisão, observamos que o número de úlceras curadas no grupo intervenção foi superior às tratadas com curativos tradicionais (Figura 4), independentemente da inclusão no controle de pacientes tratados com antibiótico tópico. Este fato deve-se a inclusão de um ensaio clínico recentemente publicado<sup>14</sup> com um grande número de pacientes testados e com resultados bastante positivos para a ozonioterapia.

Entretanto ao analisarmos o desfecho de redução da área da úlcera, não observamos no gráfico de floresta diferenças entre os dois grupos (Figura 5). Sabe-se que quanto maior a área inicial de uma ferida, maior a dificuldade para que essa ferida feche<sup>23,24</sup>. Provavelmente este fato ocorreu porque Izadi et al.<sup>19</sup> não avaliaram este desfecho. Como vimos acima, estes autores apresentaram resultados muito positivo que influenciou bastante o gráfico de floresta das úlceras curadas.

As complicações do pé diabético causam uma carga pesada nos recursos de saúde<sup>25</sup>. A taxa de hospitalização por essas lesões tem aumentado constantemente desde então, e assim os custos atuais são muito elevados<sup>26</sup>. Em nosso estudo, identificamos que pacientes tratados com ozonioterapia permanecem menos tempo internado em ambiente hospitalar (Figura 6). Desta maneira, ozonioterapia parece acelerar o processo de alta hospitalar, prevenindo o risco de infecção e complicações, como também, reduzindo custos de tratamento.

O estresse oxidativo parece ser um fator que prejudica a cicatrização das UPD. Um alto nível de peroxidação lipídica com quantidade insuficiente de enzimas antioxidantes e redução do estado antioxidante total no plasma pode levar à ulceração crônica e a uma reação inflamatória prolongada<sup>27</sup>. Enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e a glutathione redutase protegem os vários tecidos do corpo contra o dano oxidativo. Enquanto isso, o superóxido dismutase e a atividade do malondialdeído (MDA) são significativamente mais elevadas nos linfócitos de pacientes diabéticos possuindo úlcera crônica<sup>28</sup>. Há estudos que sugerem que o ozônio pode estar relacionado a fatores de crescimento e que pode ativar o sistema antioxidante, o que favorece a angiogênese e facilita o processo cicatricial<sup>11,22</sup>. Dois estudos<sup>16,19</sup> avaliaram o sistema oxidativo após o uso de O<sub>3</sub>.

Os níveis de MDA são indicativos da extensão de peroxidação lipídica como resultado da degeneração oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados, aumento da geração de radicais livres e prejuízos de defesas antioxidantes<sup>29</sup>. Assim, níveis aumentados de MDA associam-se a maior complicação para cronicidade da úlcera do pé diabético<sup>30</sup>. No estudo de Martínez-Sánchez et al<sup>19</sup> há um aumento do nível de MDA em ambos os grupos, porém este incremento é maior no grupo controle. Enquanto isso, Rosul et al<sup>16</sup>, os valores apresentam pequeno decréscimo, sendo esta redução maior no grupo intervenção. Desta forma, em ambos os estudos podemos perceber que o nível de MDA é comparativamente menor para aqueles tratados com ozônio, indicando que este tratamento reduz a degeneração lipídica e geração de radicais livres em úlceras diabéticas.

A catalase é considerada uma importante enzima antioxidante, localizada em peroxissomos, decompõe o peróxido de hidrogênio, uma substância tóxica para as células, em água e oxigênio<sup>28</sup>. Na tabela 4, podemos observar que ambos os autores identificaram um aumento significativo da ação desta enzima nos indivíduos tratados com O<sub>3</sub>, enquanto nos controles praticamente não há alteração da atuação desta enzima. Este achado indica favorecimento ao processo cicatricial em virtude do efeito antioxidante da catalase.

A hiperglicemia também interfere no sistema oxidativo, provocando manifestações pró-apoptóticas que são principalmente identificadas através de índices alterados de estresse oxidativo no meio linfocítico<sup>28</sup>. Estudos mostram que as propriedades antioxidantes do ozônio preservam as funções das células  $\beta$ , levando a redução da hiperglicemia<sup>11,22</sup> e prevenindo danos oxidativos em componentes celulares, que poderiam também afetar o nível de glicemia<sup>20,22</sup>. Izadi et al. 2019<sup>14</sup> e



Martínez-Sánchez et al<sup>19</sup> mostraram em seus resultados a redução significativa dos valores glicêmicos no grupo tratado com ozônio em comparação ao controle.

A cada 30 segundos, um membro inferior ou parte de um membro inferior é perdido para a amputação em algum lugar do mundo, como consequência do diabetes<sup>31</sup>. Em países de alta renda, aproximadamente 1% das pessoas com diabetes sofrem amputação de membros inferiores. Em países de baixa e média renda, amputação como complicação das UPD são mais comuns<sup>31-33</sup>. Apesar de serem grandes as chances de complicações das lesões do pé diabético, pudemos observar na Figura 7 a redução da taxa de amputações dos pacientes tratados no grupo intervenção comparado ao grupo controle. Com um menor índice de amputações, conclui-se que a ozonioterapia é uma opção viável para minimizar os efeitos adversos que podem evoluir para um desfecho indesejável.

A principal limitação desta revisão sistemática deve-se a má qualidade dos estudos primários. A maior parte dos ensaios foi classificada como de alto risco de viés em todos os domínios avaliados. A metodologia empregada pela maior parte dos autores falha na seleção dos participantes, randomização, cegamento, seguimento dos participantes e na apresentação incompleta de desfechos. Todas estas equívocos podem provocar prejuízo na validade interna destes estudos<sup>34</sup>, e consequentemente, impedem que esta revisão sistemática consiga apresentar resultados mais contundentes sobre a eficácia desta terapia.

Os efeitos positivos do ozônio no aumento da taxa de cicatrização (úlceras curadas), menor tempo de internação hospitalar, melhora do perfil oxidativo, redução da glicemia e redução das taxas de amputação sugerem um potencial bastante promissor para esta terapia no tratamento de UDPs.

## REFERÊNCIAS

1. Karri VVSR, Kuppusamy G, Talluri SV, Yamjala K, Mannemala SS, Malayandi R. Current and emerging therapies in the management of diabetic foot ulcers. *Curr Med Res Opin* [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2019 Jan 22];32(3):519–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26643047>
2. Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. Ingelfinger JR, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jun 15 [cited 2019 Jan 22];376(24):2367–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28614678>
3. Jeyaraman K, Berhane T, Hamilton M, Chandra AP, Falhammar H. Mortality in patients with diabetic foot ulcer: a retrospective study of 513 cases from a single Centre in the Northern Territory of Australia. *BMC Endocr Disord* [Internet]. 2019 Dec 3;19(1):1. Available from: <https://bmcendocrdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12902-018-0327-2>
4. Țânțu MM, Man GM, Rogozea LM, Domnariu CD, Pleșa FC, Trașcă DM, et al. Diabetic foot - epidemiological and histopathological aspects. *Rom J Morphol Embryol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 21];59(3):895–902. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30534831>
5. Regulski M. Understanding Diabetic Induction of Cellular Senescence: A Concise Review. *Wounds a Compend Clin Res Pract* [Internet]. 2018 Apr [cited 2019 Jan 22];30(4):96–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29718819>
6. García-Honduvilla N, Cifuentes A, Ortega MA, Pastor M, Gainza G, Gainza E, et al. Immuno-modulatory effect of local rhEGF treatment during tissue repair in diabetic ulcers. *Endocr Connect* [Internet]. 2018 Apr [cited 2019 Jan 22];7(4):584–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29592858>
7. Paggiaro AO, Menezes AG, Ferrassi AD, Carvalho VF De, Gemperli R. Biological effects of amniotic membrane on diabetic foot wounds: a systematic review. *J Wound Care*. 2018;27(2):19–25.
8. Izadi M, Jafari NJ, Hosseini MS, Saafaat O. Therapeutic effects of ozone in patients with diabetic foot ulcers: review of the literature. *Biomed Res* [Internet]. [cited 2019 Jan 22];28(18). Available from: <http://www.alliedacademies.org/articles/therapeutic-effects-of-ozone-in-patients-with-diabetic-foot-ulcers-review-of-the-literature-8469.html>

9. Liu J, Zhang P, Tian J, Li L, Li J, Tian JH, et al. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2015 Oct 27;(6):CDO11979. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD008474.pub2>
10. Izadi M, Bozorgi M, Hosseine MS, Khalili N, Jonaidi-Jafari N. Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2018 Nov [cited 2019 Jan 22];97(48):e12505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30508881>
11. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;2(1):66–70.
12. Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ* [Internet]. 2015 Jan 2;349(jan02 1):g7647–g7647. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.g7647>
13. Agoritsas T, Merglen A, Courvoisier DS, Combescure C, Garin N, Perrier A, et al. Sensitivity and predictive value of 15 PubMed search strategies to answer clinical questions rated against full systematic reviews. *J Med Internet Res.* 2012;14(3).
14. Izadi M, Kheirjou R, Mohammadpour R, Aliyoldashi MH, Moghadam SJ, Khorvash F, et al. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Jan 16];13(1):822–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30641815>
15. Teuvov AA, Baziev AM, Lovpache ZN, Teunikova IS, Chudopal SM. Ozone therapy in the comprehensive treatment of diabetic foot syndrome. *Biomed Pharmacol J.* 2017;10(4):1871–8.
16. Rosul M V, Patskan BM. Ozone therapy effectiveness in patients with ulcerous lesions due to diabetes mellitus. *Wiad Lek.* 2016;69(1):7–9.
17. Zhang J, Guan M, Xie C, Luo X, Zhang Q, Xue Y. Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014.
18. Wainstein J, Feldbrin Z, Boaz M, Harman-Boehm I. Efficacy of Ozone–Oxygen Therapy for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Technol Ther*

- [Internet]. 2011;13(12):1255–60. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/dia.2011.0018>
19. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol*. 2005;523(1–3):151–61.
  20. Kushmakov R, Gandhi J, Seyam O, Jiang W, Joshi G, Smith N, et al. Ozone therapy for diabetic foot. *Med Gas Res [Internet]*. 2018;8(3):111. Available from: <http://www.medgasres.com/text.asp?2018/8/3/111/241076>
  21. Volmer-Thole M, Lobmann R. Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2016 Jun 10 [cited 2019 Jan 28];17(6):917. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294922>
  22. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound J*. 2018;1–12.
  23. Soewondo P, Suyono S, Sastrosuwignyo MK, Harahap AR, Sutrisna B, Makmun LH. Prediction of Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers: an Observational Study in Tertiary Hospital in Indonesia. *Acta Med Indones [Internet]*. 2017 Jan [cited 2019 Jan 30];49(1):41–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28450653>
  24. Takahashi PY, Kiemele LJ, Chandra A, Cha SS, Targonski P V. A retrospective cohort study of factors that affect healing in long-term care residents with chronic wounds. *Ostomy Wound Manage [Internet]*. 2009 Jan [cited 2019 Jan 30];55(1):32–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174587>
  25. Cawich SO, Islam S, Hariharan S, Harnarayan P, Budhooram S, Ramsewak S, et al. The economic impact of hospitalization for diabetic foot infections in a Caribbean nation. *Perm J [Internet]*. 2014 [cited 2019 Jan 30];18(1):e101-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626079>
  26. Hicks CW, Selvarajah S, Mathioudakis N, Perler BA, Freischlag JA, Black JH, et al. Trends and determinants of costs associated with the inpatient care of diabetic foot ulcers. *J Vasc Surg [Internet]*. 2014 Nov [cited 2019 Jan 30];60(5):1247–1254.e2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939079>
  27. Vairamon SJ, Babu M, Viswanathan V. Oxidative stress markers regulating the healing of foot ulcers in patients with type 2 diabetes. *Wounds a Compend Clin Res Pract [Internet]*. 2009 Oct [cited 2019 Jan 30];21(10):273–9. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25902714>
28. Arya AK, Pokharia D, Tripathi K. Relationship between oxidative stress and apoptotic markers in lymphocytes of diabetic patients with chronic non healing wound. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2011 Dec [cited 2019 Jan 29];94(3):377–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21872354>
  29. Singh SK, Sahay RK, Krishna A. Oxidative stress in diabetic foot ulcer. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2019 Jan 29];2(2):109–13. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871402108000192>
  30. Rattan R, Nayak D. High Levels of Plasma Malondialdehyde, Protein Carbonyl, and Fibrinogen Have Prognostic Potential to Predict Poor Outcomes in Patients With Diabetic Foot Wounds: A Preliminary Communication. *Int J Low Extrem Wounds* [Internet]. 2008 Dec [cited 2019 Jan 29];7(4):198–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18815200>
  31. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 8th edn.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2017.
  32. Ministério da Saúde. *Manual do pé diabético : estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica.* Brasília; 2016.
  33. *Diabetes Care. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.* Am Diabetes Assoc. 2014;37(January):81–90.
  34. Pedrosa Viegas de Carvalho AI, Silva VI, José Grande III A. *Medicina baseada em evidências Avaliação do risco de viés de ensaios clínicos randomizados pela ferramenta da colaboração Cochrane* [Internet]. Vol. 18, Diagn Tratamento. 2013 [cited 2019 Jan 29]. Available from: <http://www>.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise dos estudos selecionados, foi possível observar um bom desempenho da ozonioterapia no tratamento de úlceras do pé diabético. Apresentando efeito positivo no número de úlceras cicatrizadas, menor tempo de internação hospitalar, melhora no perfil oxidativo, redução da glicemia e redução da taxa de amputações, comparadas ao tratamento convencional. Esses resultados favorecem a aplicação do ozônio como tratamento para úlceras do pé diabético, sugerindo bom potencial para indicação na prática clínica.

No entanto, pelo número ainda insuficiente de ensaios clínicos, e devido a baixa qualidade dos artigos selecionados, propõe-se que mais pesquisas sejam realizadas para validar as propostas pertinentes ao uso do ozônio e assegurar ainda mais sua prática clínica.

## 6. REFERÊNCIAS

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2017.
2. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. São Paulo. 2018.
3. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2013;103(2):137–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>
4. Robbins JM, Strauss G, Aron D, Long J, Kuba J, Kaplan Y. Mortality Rates and Diabetic Foot Ulcers Is it Time to Communicate Mortality Risk to Patients with Diabetic Foot Ulceration ? *J Am Podiatr Med Assoc*. 2008;98(6):489–93.
5. Diabetes Care. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Am Diabetes Assoc*. 2014;37(January):81–90.
6. Caiafa JS, Castro AA, Fidelis C, Santos VP, Simão E, Jr CJS. Atenção integral ao portador de Pé Diabético. *J Vasc Bras*. 2011;10(4):1–32.
7. Ministério da Saúde. Manual do pé diabético : estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica. Brasília; 2016.
8. Jeyaraman K, Berhane T, Hamilton M, Chandra AP, Falhammar H. Mortality in patients with diabetic foot ulcer: a retrospective study of 513 cases from a single Centre in the Northern Territory of Australia. *BMC Endocr Disord* [Internet]. 2019 Dec 3;19(1):1. Available from: <https://bmcendocrdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12902-018-0327-2>
9. REIBER GE, LEMASTER JW. EPIDEMIOLOGY AND ECONOMIC IMPACT OF FOOT ULCERS AND AMPUTATIONS IN PEOPLE WITH DIABETES. In: Levin and O’Neal’s *The Diabetic Foot* [Internet]. Elsevier; 2008. p. 3–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323041454500089>
10. Ragnarson Tennvall G, Apelqvist J. Health-Economic Consequences of Diabetic Foot Lesions. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2004 Aug 1;39(Supplement\_2):S132–9. Available from: [http://academic.oup.com/cid/article/39/Supplement\\_2/S132/329176/HealthEconomic-Consequences-of-Diabetic-Foot](http://academic.oup.com/cid/article/39/Supplement_2/S132/329176/HealthEconomic-Consequences-of-Diabetic-Foot)

11. Țânțu MM, Man GM, Rogozea LM, Domnariu CD, Pleșa FC, Trașcă DM, et al. Diabetic foot - epidemiological and histopathological aspects. *Rom J Morphol Embryol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 21];59(3):895–902. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30534831>
12. García-Honduvilla N, Cifuentes A, Ortega MA, Pastor M, Gainza G, Gainza E, et al. Immuno-modulatory effect of local rhEGF treatment during tissue repair in diabetic ulcers. *Endocr Connect* [Internet]. 2018 Apr [cited 2019 Jan 22];7(4):584–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29592858>
13. Sinwar PD. The diabetic foot management – Recent advance. *Int J Surg* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2019 Jan 21];15:27–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743919115000412>
14. Noor S, Zubair M, Ahmad J. Diabetic foot ulcer—A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2015 Jul [cited 2019 Jan 21];9(3):192–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25982677>
15. Paggiaro AO, Menezes AG, Ferrassi AD, Carvalho VF De, Gemperli R. Biological effects of amniotic membrane on diabetic foot wounds: a systematic review. *J Wound Care*. 2018;27(2):19–25.
16. Chicone G, de Carvalho VF, Paggiaro AO. Use of Oxidized Regenerated Cellulose/Collagen Matrix in Chronic Diabetic Foot Ulcers. *Adv Skin Wound Care* [Internet]. 2018 Feb;31(2):66–71. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00129334-201802000-00003>
17. Regulski M. Understanding Diabetic Induction of Cellular Senescence: A Concise Review. *Wounds a Compend Clin Res Pract* [Internet]. 2018 Apr [cited 2019 Jan 22];30(4):96–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29718819>
18. Liu J, Zhang P, Tian J, Li L, Li J, Tian JH, et al. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2015 Oct 27;(6):CDO11979. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD008474.pub2>
19. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1):66–70.
20. Kushmakov R, Gandhi J, Seyam O, Jiang W, Joshi G, Smith N, et al. Ozone therapy for diabetic foot. *Med Gas Res* [Internet]. 2018;8(3):111. Available from:



- <http://www.medgasres.com/text.asp?2018/8/3/111/241076>
21. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound J*. 2018;1–12.
  22. Izadi M, Bozorgi M, Hosseini MS, Khalili N, Jonaidi-Jafari N. Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2018 Nov [cited 2019 Jan 22];97(48):e12505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30508881>
  23. Izadi M, Jafari NJ, Hosseini MS, Saafaat O. Therapeutic effects of ozone in patients with diabetic foot ulcers: review of the literature. *Biomed Res* [Internet]. [cited 2019 Jan 22];28(18). Available from: <http://www.alliedacademies.org/articles/therapeutic-effects-of-ozone-in-patients-with-diabetic-foot-ulcers-review-of-the-literature-8469.html>
  24. Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ* [Internet]. 2015 Jan 2;349(jan02 1):g7647–g7647. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.g7647>
  25. Agoritsas T, Merglen A, Courvoisier DS, Combescure C, Garin N, Perrier A, et al. Sensitivity and predictive value of 15 PubMed search strategies to answer clinical questions rated against full systematic reviews. *J Med Internet Res*. 2012;14(3).