



VINÍCIUS FROTA FERREIRA DOS SANTOS

**USO DO OZÔNIO NO MODELO DE RETINOPATIA
DIABÉTICA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**LAVRAS - MG
2025**

VINÍCIUS FROTA FERREIRA DOS SANTOS

**USO DO OZÔNIO NO MODELO DE RETINOPATIA DIABÉTICA EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Prof. Dr. Rogério Magno do Vale Barroso

Coorientador

LAVRAS – MG

2025

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Santos, Vinícius Frota Ferreira dos.

Uso do ozônio no modelo de retinopatia diabética em zebrafish
(*Danio rerio*) : Use of ozone in the diabetic retinopathy model in
zebrafish (*Danio rerio*) / Vinícius Frota Ferreira dos Santos. - 2025.
78 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Rogério Magno do Vale Barroso.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Modelo animal. 2. Ozônio. 3. Olhos. I. Murgas, Luis David
Solis. II. Barroso, Rogério Magno do Vale. III. Título.

VINÍCIUS FROTA FERREIRA DOS SANTOS

**USO DO OZÔNIO NO MODELO DE RETINOPATIA DIABÉTICA EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**USE OF OZONE IN THE DIABETIC RETINOPATHY MODEL IN
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 30 de janeiro de 2025.

Dra. Zullyt Bárbara Zamora Rodríguez – CNIC, Cuba.

Dra. Maria Inês Doria Rossi – ICTB/Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna – UFPR, Brasil.

Dra. Daniella Aparecida de Jesus Paula (suplente) – UFPI, Brasil.

Dr. Marcos Ferrante (suplente) – UFLA, Brasil.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Prof. Dr. Rogério Magno do Vale Barroso

Coorientador

LAVRAS – MG

2025

AGRADECIMENTOS

Por meio deste agradeço minha família pelo apoio e incentivo para a realização dessa formação, e agradeço a equipe e colegas que auxiliaram durante a realização deste projeto.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo apoio estrutural e acadêmico que possibilitou o meu desenvolvimento profissional e a realização do projeto de pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

RESUMO

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação ocular de pacientes diabéticos que necessita de estudos para sua compreensão e desenvolvimento de tratamentos. Tais estudos podem ser realizados a partir de modelos animais como o *Danio rerio* (zebrafish), e diferentes compostos podem ser pesquisados para o controle dos mecanismos fisiopatológicos, como o ozônio (O₃). O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do O₃ no modelo hiperglicêmico da RD em zebrafish. Foram utilizados 570 zebrafish adultos em dois ensaios experimentais para avaliar os efeitos do O₃ sobre o tecido retiniano e branquial em condições normais (ensaio 1) e em tecido retiniano em animais induzidos para a doença (ensaio 2), nas concentrações de 52 e 72 µg/ml uma e duas vezes ao dia, a cada 48 horas durante 15 dias. Também foram avaliados o potencial de oxirredução (ORP) da água, morfometria, efeito oxidativo, glicemia e proteínas glicadas dos animais. Por meio do ensaio 1, o O₃ não desencadeou alterações morfométricas no tecido retiniano e branquial ($p > 0,05$) em animais hígidos. No entanto, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) das espécies reativas de oxigênio (EROs) e da enzima superóxido dismutase (SOD), indicando o desenvolvimento de um estresse oxidativo agudo e controlado, sem efeitos deletérios. No segundo ensaio, observou-se por meio do aumento significativo ($p < 0,05$) das EROs, SOD e catalase (CAT) que o zebrafish também desenvolve um quadro de estresse oxidativo. Além disso, quando tratados com o O₃, observou-se que houve melhores resultados morfométricos e acerca do estresse oxidativo, não apresentando diferenças significativas com o grupo controle negativo (CN) que permaneceu apenas em água ($p > 0,05$) e inclusive com valores da EROs, SOD e CAT significativamente menores do que animais do grupo controle positivo (CP) que foram apenas induzidos para a doença ($p < 0,05$), com exceção do grupo testado com a dosagem de 72 µg/ml duas vezes ao dia (T4), indicando que essa dosagem em animais doentes passa do limiar de efeitos benéficos e acarreta efeitos tóxicos. Baseando-se nesses achados, conclui-se que protocolos de O₃ utilizados são seguros quanto sua aplicabilidade na água e a saúde branquial, além de não acarretar em alterações no tecido retiniano sadio, além disso, quando utilizado em animais doentes, o mesmo proporcionou um melhor controle do quadro de neurodegeneração e de estresse oxidativo, dessa forma, é possível indicar a realização de novos estudo na espécie com esse composto para melhor compreensão desses resultados e seu possível mecanismos de ocorrência.

Palavras-chave: Morfometria; Estresse oxidativo; Olhos; Ozônio; Modelo animal.

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is an ocular complication in diabetic patients that requires studies to understand it and develop treatments. Such studies can be performed using animal models such as *Danio rerio* (zebrafish), and different compounds can be investigated to control the pathophysiological mechanisms, such as ozone (O₃). The objective of this study is to evaluate the effects of O₃ in the hyperglycemic model of DR in zebrafish. 570 adult zebrafish were used in two experimental trials to evaluate the effects of O₃ on retinal and gill tissue under normal conditions (trial 1) and on retinal tissue in animals induced for the disease (trial 2), at concentrations of 52 and 72 µg/ml once and twice a day, every 48 hours for 15 days. The redox potential (ORP) of water, morphometry, oxidative effect, glycemia and glycated proteins of the animals were also evaluated. In test 1, O₃ did not trigger morphometric changes in retinal and gill tissue ($p > 0.05$) in healthy animals. However, a significant increase ($p < 0.05$) in reactive oxygen species (ROS) and superoxide dismutase (SOD) was observed, indicating the development of acute and controlled oxidative stress, without deleterious effects. In the second test, it was observed through the significant increase ($p < 0.05$) in ROS, SOD and catalase (CAT) that the zebrafish also develop a picture of oxidative stress. Furthermore, when treated with O₃, it was observed that there were better morphometric results and results regarding oxidative stress, with no significant differences compared to the negative control group (CN) that remained only in water ($p > 0.05$) and even with significantly lower EROs, SOD and CAT values than animals in the positive control group (CP) that were only induced for the disease ($p < 0.05$), with the exception of the group tested with the dosage of 72 µg/ml twice a day (T4), indicating that this dosage in sick animals exceeds the threshold of beneficial effects and causes toxic effects. Based on these findings, it is concluded that the O₃ protocols used are safe in terms of their applicability in water and gill health, in addition to not causing changes in healthy retinal tissue. Furthermore, when used in sick animals, it provided better control of the neurodegeneration and oxidative stress. Therefore, it is possible to indicate the carrying out of new studies in the species with this compound to better understand these results and their possible mechanisms of occurrence.

Keywords: Morphometrics; Oxidative stress; Eyes; Ozone; Animal model.

IMPACTO SOCIAL, TECNOLÓGICO, ECONÔMICO E CULTURAL

A retinopatia diabética é uma complicação importante do diabetes, afetando humanos e animais, particularmente diabéticos crônicos, e pode se apresentar como lesões proliferativas ou não proliferativas, afetando a acuidade visual e sendo uma das principais causas de cegueira no mundo. Dessa forma diversos estudos quanto a fisiopatologia e abordagens terapêuticas são focos de pesquisas atuais, incluindo-se os que envolvem os modelos animais, como os peixes *Danio rerio*. Entretanto, até o momento, a maioria dos estudos na espécie se limitam a modelagem da doença, necessitando assim pesquisas que estudem sua adaptação para abordagens terapêuticas. Quanto ao ozônio (O₃), trata-se de uma molécula oxidante com diversos efeitos sistêmicos benéficos quando usados corretamente, além disso, já existem evidências sobre os efeitos sobre a doença em modelos roedores. Entretanto, apenas dois estudos foram realizados até o momento, de forma que mais pesquisas são necessárias para o melhor entendimento do composto e de suas ações. Tendo em vistas esses conceitos, o presente trabalho tem grande impacto sobre a temática da saúde, uma vez que foca em estudar uma abordagem terapêutica utilizando-se do O₃ para enfermidades retinianas, situação inovadora uma vez que trata-se do primeiro estudo com essa abordagem a ser descrito na espécie, que é um modelo animal de suma importância para o desenvolvimento de terapias que são requeridas na área da saúde humana e veterinária. Além disso, o mesmo evidenciou pela primeira vez que a espécie modela o mecanismo oxidativo da doença, e que o uso do composto foi eficiente para o seu controle, e consequentemente para o controle do processo neurodegenerativo retiniano, tais são inovadores tanto para a medicina humana e veterinária e serviram de base para novos estudos na espécie com esse e outros compostos para o controle desse mecanismo, e posteriormente a maior compreensão e desenvolvimento de pesquisas em mamíferos, e sua futura aplicabilidade para a saúde humana.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

Diabetic retinopathy is a major complication of diabetes, affecting humans and animals, particularly chronic diabetics, and can present as proliferative or non-proliferative lesions, affecting visual acuity and being one of the main causes of blindness worldwide. Therefore, several studies on pathophysiology and therapeutic approaches are the focus of current research, including those involving animal models, such as the fish *Danio rerio*. However, to date, most studies on the species are limited to modeling the disease, thus requiring research that studies its adaptation to therapeutic approaches. As for ozone (O₃), it is an oxidizing molecule with several beneficial systemic effects when used correctly, and there is already evidence of its effects on the disease in rodent models. However, only two studies have been carried out to date, so more research is needed to better understand the compound and its actions. In view of these concepts, this work has a great impact on the subject of health, since it focuses on studying a therapeutic approach using O₃ for retinal diseases, an innovative situation since it is the first study with this approach to be described in the species, which is an animal model of utmost importance for the development of therapies that are required in the area of human and veterinary health. In addition, it showed for the first time that the species models the oxidative mechanism of the disease, and that the use of the compound was efficient for its control, and consequently for the control of the retinal neurodegenerative process, such are innovative for both human and veterinary medicine and served as a basis for new studies in the species with this and other compounds for the control of this mechanism, and subsequently for the greater understanding and development of research in mammals, and its future applicability for human health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquematização da classificação das manifestações e severidade da retinopatia diabética em olhos humanos	20
Figura 2 - Esquematização dos mecanismos fisiopatológicos da retinopatia diabética	21
Figura 3 - Esquematização do mecanismo inflamatório e do processo de morte celular por piroptose	24
Figura 4 - Esquematização dos processos de autofagia e apoptose celular desencadeados pelo estresse oxidativo	26
Figura 5 - Imagem histológica da retina neurosensorial (RNS), camada de fotorreceptores (CFT), camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI) e camada de células ganglionares (CCG) avaliadas no experimento	44
Figura 6 - Imagem histológica branquial com identificação da massa celular interlamelar (AMCI), espessura (EL) e altura lamelar (AL) avaliadas no experimento	45
Figura 7 - Mensuração da glicemia sanguínea dos zebrafish. A. Animal seco sobre papel filme. B. Secção da nadadeira caudal para coleta de sangue. C. Aplicação do sangue coletado a partir da nadadeira caudal seccionada na tira do glicosímetro glicosímetro Accu-Chek Active®	48
Figura 8 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão dos níveis de ORP calculados nos deltas do ensaio 1. A. Delta 1. B. Delta 2	49
Figura 9 - Imagens histológicas da retina de peixes zebrafish do ensaio 1 sem evidências de alterações teciduais. A. Retina de um peixe do grupo controle. B. Retina de um peixe do grupo ozônio 1. C. Retina de um peixe do grupo ozônio 2. D. Retina de um peixe do grupo ozônio 3. E. Retina de um peixe do grupo ozônio 4	50
Figura 10 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão da espessura da retina neurosensorial e suas camadas de peixes zebrafish do ensaio 1. A. Espessura da retina neurosensorial (RNS). B. Espessura da camada de fotorreceptores (CFT). C. Espessura da camada nuclear externa (CNE). D. Espessura da camada plexiforme externa (CPE). E. Espessura da camada nuclear interna (CNI). F. Espessura da camada plexiforme interna (CPI). G. Espessura da camada de células ganglionares (CCG)	52
Figura 11 - Imagens histológicas branquiais de peixes zebrafish do ensaio 1 sem evidências de alterações teciduais. A. Brânquia de um peixe do grupo controle. B. Brânquia de um peixe do grupo ozônio 1. C. Brânquia de um peixe do grupo ozônio 2. D. Brânquia de um peixe do grupo ozônio 3. E. Brânquia de um peixe do grupo ozônio 4	54

Figura 12 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão dos parâmetros branquiais de peixes zebrafish do ensaio 1. A. Mensuração da altura lamelar. B. Mensuração da espessura lamelar. C. Mensuração da altura da massa celular interlamelar 55

Figura 13 - Mensuração dos níveis médios e desvio padrão do efeito oxidativo nos olhos de peixes zebrafish do ensaio 1. A. Mensuração das espécies reativas de oxigênio (EROs). B. Mensuração da enzima superóxido dismutase (SOD). C. Mensuração da enzima catalase (CAT). D. Mensuração da enzima glutational S-transferase (GST) 57

Figura 14 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão dos níveis de ORP calculados nos deltas do ensaio 2. A. Delta 1. B. Delta 2 59

Figura 15 - Imagens histológicas da retina de peixes zebrafish sem evidências de alterações teciduais. A. Retina de um peixe do grupo controle negativo. B. Retina de um peixe do grupo controle positivo. C. Retina de um peixe do grupo teste 1. D. Retina de um peixe do grupo teste 2. E. Retina de um peixe do grupo teste 3. F. Retina de um peixe do grupo teste 4 63

Figura 16 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão da espessura da retina neurosensorial e suas camadas de peixes zebrafish do ensaio 2. A. Espessura da retina neurosensorial (RNS). B. Espessura da camada de fotorreceptores (CFT). C. Espessura da camada nuclear externa (CNE). D. Espessura da camada plexiforme externa (CPE). E. Espessura da camada nuclear interna (CNI). F. Espessura da camada plexiforme interna (CPI). G. Espessura da camada de células ganglionares (CCG) 65

Figura 17 - Mensuração dos níveis médios e desvio padrão do efeito oxidativo nos olhos de peixes zebrafish. A. Mensuração das espécies reativas de oxigênio (EROs). B. Mensuração da enzima superóxido dismutase (SOD). C. Mensuração da enzima catalase (CAT). D. Mensuração da enzima glutational S-transferase (GST) 69

Gráfico 1 - Mensuração dos níveis médios e desvio padrão da glicemia sanguínea dos peixes zebrafish do ensaio 2 60

Gráfico 2 - Mensuração dos níveis médios e desvio padrão das proteínas glicadas dos olhos de peixes zebrafish do ensaio 2 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação e descrição dos grupos experimentais do ensaio 1	40
Tabela 2 - Identificação e descrição dos grupos experimentais do ensaio 2	41
Tabela 3 - Tabela de concentração do ozônio fornecida pelo fabricante	42
Tabela 4 - Dimensão de efeito dos grupos ozônio em comparação ao controle quando aos parâmetros da resposta oxidativa que apresentaram diferenças estatísticas evidenciadas	58
Tabela 5 - Dimensão de efeito dos grupos expostos a glicose testes em comparação ao controle negativo	61
Tabela 6 - Dimensão de efeito sobre a frutossamina dos grupos expostos a glicose testes em comparação ao controle negativo	62
Tabela 7 - Dimensão de efeito dos grupos testes em comparação ao controle positivo nos parâmetros morfométricos retinianos que houve diferenças estatísticas evidenciadas	66
Tabela 8 - Dimensão de efeito dos grupos testes em comparação ao controle positivo quando aos parâmetros da resposta oxidativa que houve diferenças estatísticas evidenciadas	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLA E SÍMBOLOS

ADCC	Citotoxicidade celular
AGEs	Produtos finais da glicação avançada
CAT	Catalase
CCG	Camada de células ganglionares
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CFT	Camada de fotorreceptores
CFN	Camada de fibras nervosas
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada plexiforme interno
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CPE	Camada plexiforme externa
CPI	Camada plexiforme interna
DAG	Diacilglicerol
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DM	Diabetes mellitus
DPF	Dias após a fertilização
eIF2 α	Fator de iniciação eucariótica 2 alfa
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
EPR	Epitélio pigmentado da retina
ERG	Eletroretinografia
EROs	Espécies reativas de oxigênios
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GLUT1	Transportador de glicose 1
GPx	Glutathione peroxidase

GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
HIF-1	Fator 1 induzível por hipóxia
HIF-1 α	Fator 1 induzível por hipóxia alfa
H ₂ O ₂	Perióxido de hidrogênio
HO-1	Hemo oxigenasse 1
HSPs	Proteínas de choque térmico
HPF	Horas após a fertilização
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-18	Interleucina 18
IRE1- α	Enzima tipo 1 que requer inositol
LC3	Microtúbulos 1 de cadeia leve 3
LO	Radicais alcoxi
LOO	Lipoperóxidos
LOOH	Pipoproperanos
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MDA	Malodialdeído
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
MMP	Metaloproteinases
mV	Milivolts
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinimida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta

NgR	Receptor de proteínas Nogo
NLRP3	Inflamassoma receptor semelhante a NOD contendo domínio pirin 3
NR2B	N-metil D-aspartato subtipo 2B
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
ORP	Potencial de oxirredução
PKC	Proteína quinase C
POLs	Produtos oxidantes lipídicos
PRP	Fotocoagulação panretiniana
RAGES	Receptores dos produtos finais da glicação avançada
RD	Retinopatia diabética
RDP	Retinopatia diabética proliferativa
RDNP	Retinopatia diabética não proliferativa
RNA	Ácidos ribonucleicos
RNS	Retina neosorrensorial
STAT3	Fator de transcrição ativado por tirosinas quinases
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TXNIP	Tioredoxina-interactina
VCAM-1	Molécula de adesão de células vasculares 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ZO-1	Proteína 1 da zônula ocular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. Retinopatia diabética	19
2.1.1. Classificação da retinopatia diabética	19
2.1.2. Fisiopatologia da retinopatia diabética	20
2.1.2.1. Mecanismo hiperglicêmico e vias metabólicas da glicose	21
2.1.2.2. Mecanismo vascular	22
2.1.2.3. Mecanismo inflamatório	23
2.1.2.4. Mecanismo oxidativo	24
2.1.3. Abordagens terapêuticas da retinopatia diabética	26
2.1.4. Retinopatia diabética em outras espécies	27
2.2. <i>Danio rerio</i> como modelo de doenças oftálmicas	28
2.2.1. Morfologia, processamento visual e desenvolvimento ocular de peixes <i>Danio rerio</i>	28
2.2.1.1. Estrutura morfológica ocular do zebrafish	28
2.2.1.2. Processamento visual do zebrafish	30
2.2.1.3. Desenvolvimento ocular do zebrafish	30
2.2.2. <i>D. rerio</i> como modelo experimental da retinopatia diabética	31
2.2.2.1. Modelos experimentais genéticos da retinopatia diabética	31
2.2.2.2. Modelos experimentais induzidos da retinopatia diabética	32
2.3. Ozônio	33
2.3.1. Efeitos biológicos do ozônio	33
2.3.1.1. Efeitos de oxigenação	35
2.3.1.2. Efeitos antioxidantes	35
2.3.1.3. Efeitos imunológicos	35
2.3.1.4. Efeitos cicatrizantes	36
2.3.1.5. Efeitos antimicrobianos	37
2.3.2. Uso do ozônio na retinopatia diabética	37

3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Declaração de ética.....	39
4.2. Modelo animal	39
4.3. Ensaio experimental.....	40
4.3.1. Ensaio 1: Avaliação dos efeitos do ozônio sobre o tecido retiniano e branquial em zebrafish.....	40
4.3.2. Ensaio 2: Uso do ozônio durante o desenvolvimento da retinopatia diabética no modelo Zebrafish.....	40
4.3.2.1. Protocolo de exposição experimental do ensaio 2.....	41
4.3.3. Ozonização da água dos aquários experimentais	42
4.4. Técnicas avaliativas.....	42
4.4.1. Mensuração do potencial de oxirredução	42
4.4.2. Processamento e análises morfológicas dos olhos.....	43
4.4.3. Processamento e análises morfológicas das brânquias	44
4.4.4. Mensuração das proteínas glicadas e do efeito oxidativo nos olhos.....	45
4.4.4.1. Análise das proteínas glicadas nos olhos	45
4.4.4.2. Análise das espécies reativas de oxigênio dos olhos.....	46
4.4.4.3. Análise da atividade das enzimas antioxidantes dos olhos.....	46
4.4.5. Mensuração de glicemia.....	47
4.5. Análises estatísticas	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Ensaio 1: Avaliação dos efeitos do ozônio sobre o tecido retiniano e branquial em Zebrafish	48
5.1.1. Mensuração do potencial de oxirredução	48
5.1.2. Análises morfológicas dos olhos	49
5.1.3. Análises morfológicas das brânquias.....	53
5.1.4. Avaliação do efeito oxidativo nos olhos	56
5.2. Ensaio 2: Uso do ozônio durante o desenvolvimento da retinopatia diabética no modelo Zebrafish.....	59
5.2.1. Mensuração do potencial de oxirredução	59
5.2.2. Mensuração da glicemia	60
5.2.3. Análise das proteínas glicadas dos olhos	61
5.2.4. Análises morfológicas dos olhos	63

5.2.5. Avaliação do efeito oxidativo nos olhos	68
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

A retinopatia diabética trata-se de uma das principais complicações do diabetes mellitus que acomete os seres humanos. Além disso, a enfermidade também é descrita em outras espécies animais, como cães e gatos. A afecção é mais observada em pacientes diabéticos crônicos e pode apresentar-se de forma proliferativa ou não proliferativa, além disso, podem ter graus variados de severidade, influenciando assim desde a diminuição da acuidade visual e até mesmo quadros de cegueira (FUNG et al., 2022; TAN; WONG, 2023).

Devido a sua importância mundial, diversos estudos acerca do seu mecanismo fisiopatológico e de possíveis abordagens terapêuticas foram desenvolvidas, incluindo-se os que envolvem os modelos animais, como os peixes *Danio rerio*, espécie também conhecida como zebrafish. A espécie apresenta características anatomofuncionais semelhantes aos mamíferos, além de características favoráveis para sua utilização em modelos iniciais de pesquisas antes de etapas posteriores em mamíferos. Dentre estas características, destacam-se o fácil manejo, custo-benefício, facilidade de trabalhar com um número maior de animais em grupos experimentais, entre outras. Entretanto, até o momento, a maioria dos estudos na espécie se limitam a modelagem da doença, necessitando assim pesquisas que estudem sua adaptação para abordagens terapêuticas (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

A partir desses modelos animais, diversas características do desenvolvimento da doença e de futuras terapias já foram apresentadas na literatura científica, como os mecanismos hiperglicêmicos, vasculares, inflamatórios e oxidativos, além de abordagens terapêuticas cirúrgicas e farmacológicas, como o uso de antifator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF) e o ozônio (DUH; SUN; STITT, 2017; MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021). Quanto ao ozônio, trata-se de uma molécula oxidante com diversos efeitos sistêmicos benéficos aos organismos biológicos quando usado corretamente. Além disso, já existem evidências sobre os efeitos benéficos dos compostos sobre a doença em modelos roedores. Entretanto, apenas dois estudos foram realizados até o momento na espécie, de forma que mais pesquisas são necessárias para o melhor entendimento do composto e de suas ações (LIU, 2016; SCIORSCI et al., 2020; XIE et al., 2016).

Tendo em vistas esses conceitos, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas acerca do uso do modelo zebrafish para retinopatia diabética com enfoque no estudo de mecanismos terapêuticos, incluindo-se o ozônio. Os resultados obtidos dessas pesquisas podem

servir de base para novos estudos com a espécie e posteriormente contribuir para uma maior compreensão e desenvolvimento de pesquisas em mamíferos.

Diante disso, o presente estudo propõe a utilização do modelo hiperglicêmico de retinopatia diabética em zebrafish para avaliar os efeitos o uso do ozônio nessa enfermidade, por meio da pesquisa quando aos aspectos do efeito biológico do composto sobre o tecido retiniano e branquial em animais saudáveis, e posteriormente, sobre o tecido retiniano de animais induzidos para a doença.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Retinopatia diabética

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação microvascular e neurodegenerativa frequente que ocorre em pacientes com diabetes mellitus (DM) tipo 1 ou tipo 2 (ANTONETTI; SILVA; STITT, 2021; FUNG et al., 2022; MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021). Sendo atualmente considerada a principal complicação ocular de pacientes diabéticos (TAN; WONG, 2023).

Estima-se que mais de 100 milhões de indivíduos possuem a RD no mundo, sendo considerada uma das principais causas de cegueira e deficiência visual na população adulta em idade ativa (ANTONETTI; SILVA; STITT, 2021; TAN; WONG, 2023). Em 2020, a RD foi considerada a quinta afecção responsável pela cegueira evitável e deficiência visual moderada a grave em indivíduos com 50 anos ou mais (FUNG et al., 2022).

Segundo estudos epidemiológicos a partir de meta-análises, a doença possui uma prevalência mundial de 22,27 a 34,6% em pacientes com diabetes entre 20 e 79 anos (FERNANDES et al., 2022; FUNG et al., 2022). No Brasil, estudos apontam uma prevalência de 36,28% (CHAGAS et al., 2023).

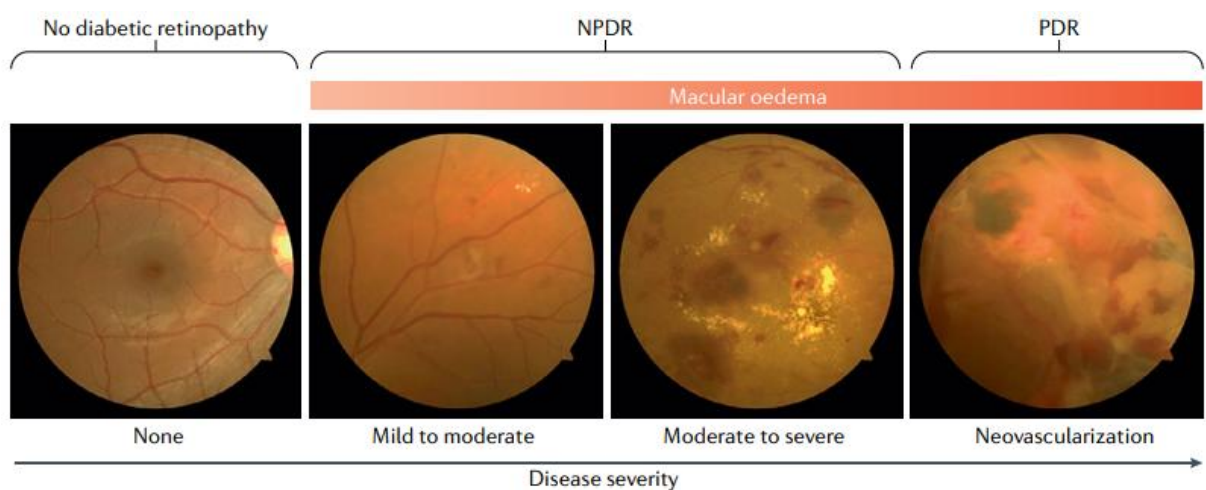
A probabilidade de desenvolver RD é altamente dependente da duração do diabetes e do nível de controle glicêmico, observada principalmente em pacientes mais crônicos da DM. Além disso, o manejo de outros fatores de risco, como hipertensão, dislipidemia, gravidez e genética, também pode ter efeitos significativos no desenvolvimento da RD (DUH; SUN; STITT, 2017; FUNG et al., 2022; MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

2.1.1. Classificação da retinopatia diabética

A enfermidade pode ser diferenciada em duas formas, a proliferativa (RDP) e a não proliferativa (RDNP), conforme exemplificado na figura 1 (DUH; SUN; STITT, 2017; FUNG

et al., 2022; MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021). A RDNP é caracterizada clinicamente por microaneurismas, vasos sanguíneos retinianos irregulares, dilatação das veias retinianas, áreas de não perfusão capilar, edema macular diabético, áreas edemaciadas e hemorragia retiniana focal ou multifocal. Já a RDP, além das alterações descritas na forma não proliferativa, a literatura descreve a presença de neovascularização retiniana e no disco óptico, além disso, formação de tecido fibroso, hemorragias vítreas e descolamentos de retina podem estar presentes (DUH; SUN; STITT, 2017; FUNG et al., 2022; MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021; PETERSEN-JONES; MOWAT, 2020). A observação dessas alterações em ambas as classificações também está relacionada ao estágio e gravidade da doença, podendo ser observadas uma ou mais alterações dependendo de cada caso (FUNG et al., 2022), conforme também observado na figura 1.

Figura 1 - Esquematisação da classificação das manifestações e severidade da retinopatia diabética em olhos humanos.



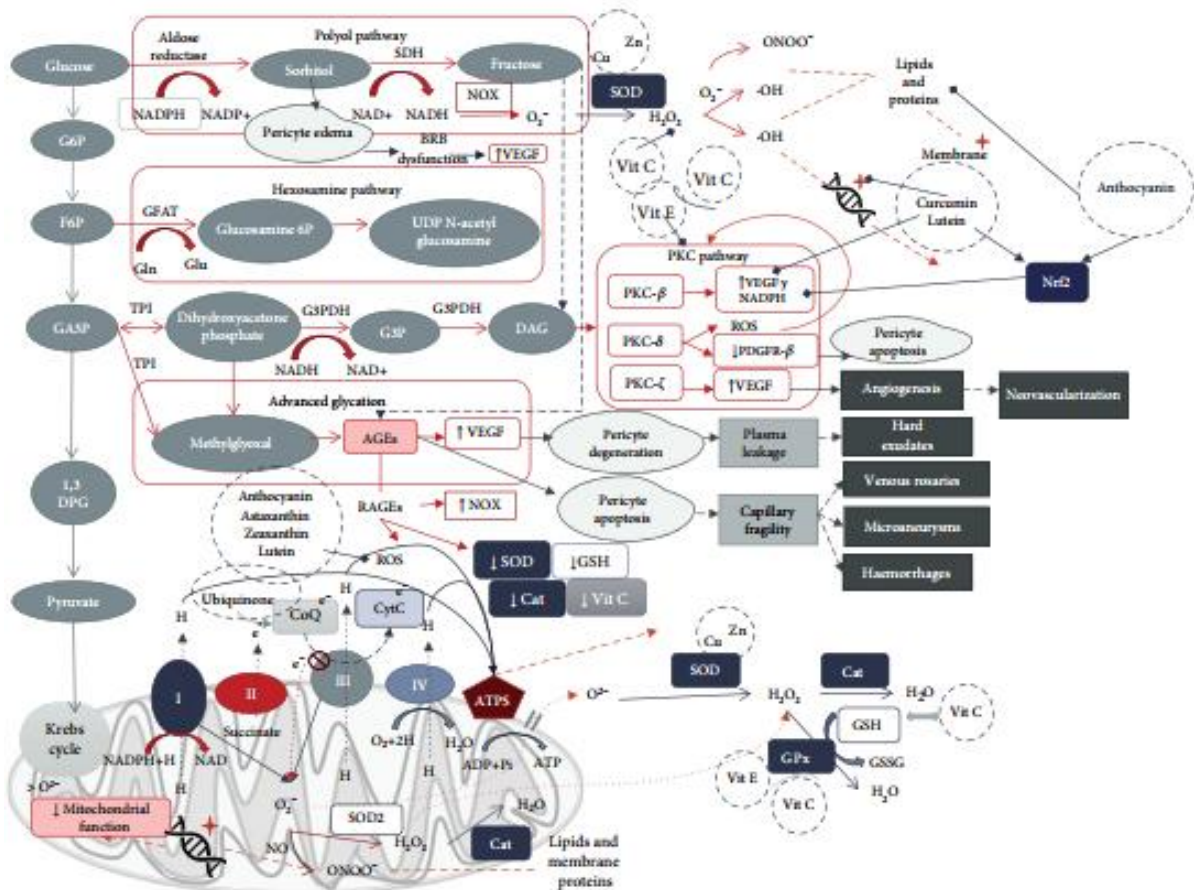
Fonte: Antonetti, Silva e Stitt (2021).

2.1.2. Fisiopatologia da retinopatia diabética

Atualmente, a RD é considerada uma doença que envolve toda a unidade neurovascular da retina, unidade essa que envolve a junção funcional e interdependência dos neurônios, células da glia e tecido vascular retinianos (DUH; SUN; STITT, 2017). O desenvolvimento da doença ocorre por um conjunto de mecanismos fisiopatológicos, que envolvem a hiperglicemia e as vias metabólicas da glicose, alterações vasculares, inflamação e estresse oxidativo que modificam todo o funcionamento da unidade neurovascular e proporcionam o aparecimento

dos danos vasculares e neuronais, conforme exemplificado na figura 2 (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019).

Figura 2 - Esquematização dos mecanismos fisiopatológicos da retinopatia diabética.



Fonte: Olvera-Montañón et al. (2019).

2.1.2.1. Mecanismo hiperglicêmico e vias metabólicas da glicose

Em relação à hiperglicemia e as vias metabólicas da glicose, pode-se considerar que essa é o ponto inicial do mecanismo fisiopatológico da RD, uma vez que os altos níveis de glicose na corrente sanguínea chegam até o tecido ocular, local no qual são utilizados em diversas vias metabólicas que influenciam no desenvolvimento da RD, como a via glicolítica, do poliol, da hexosamina e da glicação avançada. A principal via de metabolização da glicose, a via glicolítica, acaba por ser saturada pelo excesso do carboidrato. Com o aumento da atividade dessa via, ocorre a formação exacerbada de metabólitos de glicose e principalmente o excesso de formação de NADH, molécula que estará envolvida no mecanismo oxidativo da doença (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019).

A via do poliol também se destaca como uma das principais vias metabólicas da glicose, na qual por meio da enzima aldose redutase converte as moleculares de glicose em sorbitol no ambiente intracelular, principalmente nos pericitos, células associadas as células endotélio vasculares que mantém a normalidade da estrutura vascular. O acúmulo de sorbitol leva a um processo osmótico adverso com aumento do influxo de líquidos para os pericitos, ocasionando um quadro de edema de pericitos, consequentemente desencadeando em alterações das suas funções e disfunção da barreira hematorretiniana, característica essa que propicia ao mecanismo de danos vasculares (BOSCO et al., 2005; OLVERA-MONTAÑO et al., 2019). Além disso, devido a elevada a atividade dessa via, ocorre diminuição dos níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), utilizadas nas reações enzimáticas da aldose redutase e sorbitol desidrogenase, a redução dessas moléculas acarreta em redução da síntese de óxido nítrico, que desencadeia alterações como a vasoconstrição e redução do fluxo sanguíneo, consequentemente tais alterações propiciam a ocorrência de isquemia e lesão tecidual (BOSCO et al., 2005).

Outras vias envolvidas na doença, envolvem a via das hexosaminas, envolvida na formação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), envolvido na piora da RD; via da glicação avançada, envolvida na formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) e ativação dos seus receptores (RAGEs), que promovem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o estresse oxidativo. Além disso, a partir do metabolismo da glicose, ocorre formação do diacilglicerol (DAG), molécula essa envolvida na ativação de proteínas quinase C (PKC) associadas ao aumento da permeabilidade vascular, angiogênese, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e inativação do complexo IV mitocondrial (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019; TARR et al., 2013).

Além dos efeitos sobre as vias metabólicas da glicose, a hiperglicemia também estimula o aumento de um mediador inflamatório das células da glia, a tioredoxina-interactina (TXNIP), que por sua vez vai desencadear mecanismos de autofagia, indução de fatores induzidos por hipóxia e formação de inflamassomas (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019).

2.1.2.2. Mecanismo vascular

Quanto aos danos vasculares, a disfunção na barreira hematorretiniana leva a má perfusão retiniana, desencadeando uma isquemia e hipoxia tecidual que estimula o fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1), que por sua vez regula positivamente a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nos pericitos, células endoteliais e do epitélio pigmentado da retina, molécula que tem papel fundamental no aumento da permeabilidade

vascular, ativação de citosinas pró-inflamatórias, pró-oxidantes e angiogênese (BOSCO et al., 2005; OLVERA-MONTAÑO et al., 2019; RÜBSAM; PARIKH; FORT, 2018). Além disso, o aumento da permeabilidade vascular também é estimulado por citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (TANG; KERN, 2011).

Destaca-se que os danos e a necrose dos pericítos desencadeados pelas alterações metabólicas na via do poliol, acarretam em uma fragilidade aos capilares, devido à importância dessas células para a integridade dos vasos sanguíneos retinianos em associação as células endoteliais, consequentemente, essa fragilidade resulta nos microaneurismas observados nos quadros de RD (LECHNER; O'LEARY; STITT, 2017).

2.1.2.3. Mecanismo inflamatório

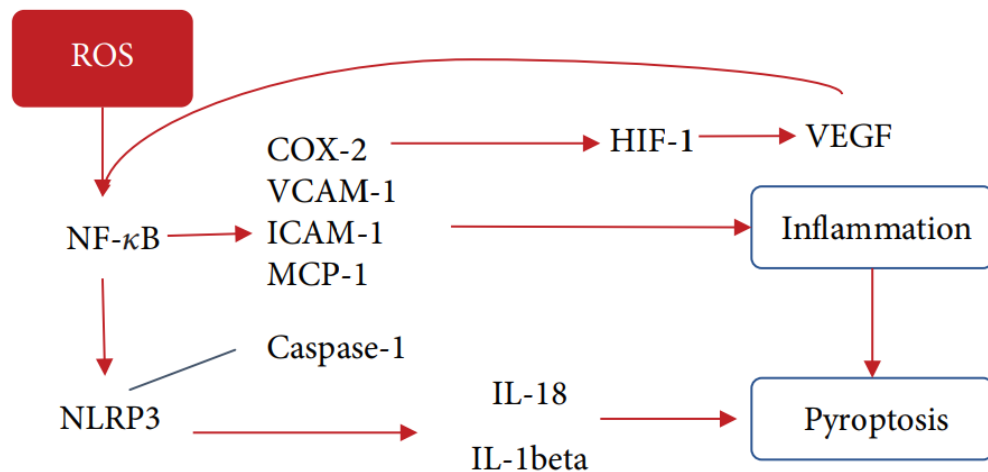
O mecanismo inflamatório presente nos casos de RD inicia-se a partir da expressão do VEGF formado a partir das alterações vasculares ou a partir das EROs formadas pelas alterações metabólicas da glicose, já que tais compostos podem promover a produção do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Uma vez expresso, essa molécula se transloca até o núcleo das células do tecido retiniano e estimula a expressão de citosinas pró-inflamatórias, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2)(OLVERA-MONTAÑO et al., 2019). Além disso, a via do NF- κ B também está relacionada à expressão de outras citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (TANG; KERN, 2011).

A ICAM-1, VCAM-1 e MCP-1 são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos e proporcionar a interação entre essas células e as células endoteliais vasculares, caracterizando assim uma leucostase, situação essa que também influencia na ruptura da barreira hematorretiniana, uma vez que esses leucócitos aderidos ao endotélio vascular também podem danificar e causa a morte dessas células, por meio do bloqueio mecânico dos capilares retinianos e secreção de citocinas inflamatórias e EROs (DUH; SUN; STITT, 2017; OLVERA-MONTAÑO et al., 2019). A COX-2 por sua vez, está envolvida na produção das prostaglandinas, moléculas essas que regulam o fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1), fator responsável por estimular a expressão do VEGF e do deslocamento do NF- κ B, proporcionando um ciclo que dá continuidade para essas rotas metabólicas (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019).

Além dos mediadores inflamatórios, o NF- κ B no núcleo celular também é responsável por proporcionar a formação de inflamassomas, principalmente do inflamassoma receptor

semelhante a NOD contendo domínio pirin 3 (NLRP3), tal molécula por sua vez leva a clivagem da caspase-1 e expressão da interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18), moléculas responsáveis por alterações danosas e rupturas das membranas celulares, processo esse denominado de piroptose, um dos processos degenerativo da RD, conforme exemplificado na figura 3 (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019).

Figura 3 - Esquematização do mecanismo inflamatório e do processo de morte celular por piroptose.



Fonte: Olvera-Montanõ et al. (2019).

2.1.2.4. Mecanismo oxidativo

O mecanismo oxidativo, por sua vez é resultado do excesso de EROs produzido durante as diferentes vias metabólicas da glicose. Tal elevação do número dessas moléculas desencadeia a quebra do equilíbrio oxidativo ou redox, proporcionando assim um estado de estresse oxidativo. Quando instaurado, tal estado é responsável por diversas alterações orgânicas da RD, como o estímulo de citocinas inflamatórias e nos processos degenerativos, como a piroptose, a autofagia e a apoptose celular (FEENSTRA; YEGO; MOHR, 2013; OLVERA-MONTAÑO et al., 2019).

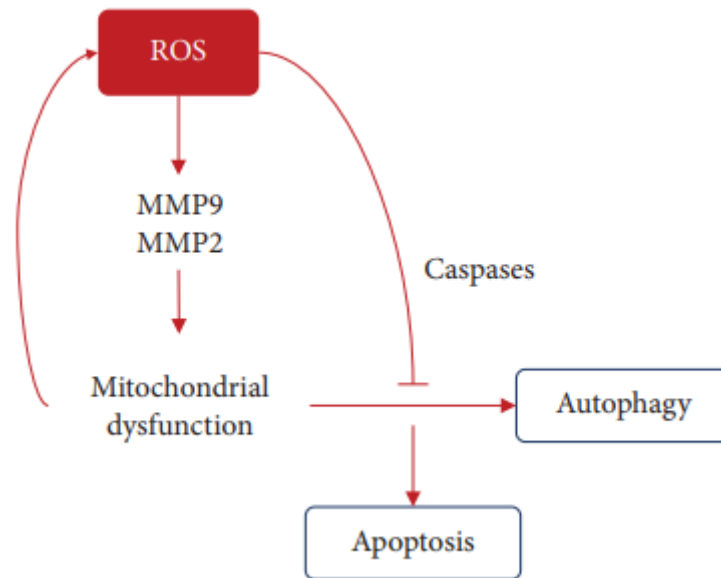
O aumento das EROs na RD ocorre devido aos quadros de hiperglicemia, que por sua vez saturam as vias de metabolização da glicose, proporcionando aumento da formação do dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADH). Uma vez que o NADH é produzido em excesso, ocorre um processo de sobrecarga do complexo mitocondrial I, que na tentativa de oxidar todo esse excesso de NADH acaba por liberar mais elétrons que reduzem parcialmente o oxigênio e formam mais superóxido. Outro modo de elevação das EROs a partir do NADH se dá por meio das enzimas da família NOX (NADPH oxidase), que a partir do NADH

aumentam a produção das EROs, além disso, essas enzimas também estão envolvidas na redução de moléculas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT); glutatona e vitamina C (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019).

Além desses mecanismos baseados na alta formação de NADH, outros mecanismos oxidativos ocorrem na RD, por exemplo, a inativação do complexo mitocondrial IV que ocorre por meio da ativação da proteína quinase δ (PKC δ) pelo DAG, o que também promove elevação na produção das EROs (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019). Outro ponto de destaque envolve a diminuição de NADPH que ocorre no organismo devido a via do poliol, molécula essa que tem papel fundamental na redução da glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH), que por sua vez age como antioxidante e mantém o equilíbrio redox do organismo, portanto, uma vez que ocorre diminuição do NADPH também ocorre diminuição de GSH, propiciando o estresse oxidativo (BOSCO et al., 2005).

Quanto às alterações orgânicas desencadeadas pelo estresse oxidativo, as mesmas estão principalmente relacionadas aos processos degenerativos na RD, decorrentes do estímulo da inflamação e piroptose descritos anteriormente, e da autofagia e apoptose celular, conforme evidenciado na figura 4. O processo de autofagia na RD desencadeado pelas EROs, ocorre devido ao processo de regulação positivas que essas moléculas proporcionam em relação a metaloproteinases do tipo 9 e 2 (MMP-9 e MMP-2), moléculas essas que por sua vez atrapalham os potenciais de membrana mitocondriais, desencadeando assim uma disfunção da organela. Essa disfunção mitocondrial é detectada pela célula na qual inicia os processos de autofagia (DI ROSA et al., 2016; KOWLURU; ZHONG; SANTOS, 2012; OLVERA-MONTAÑO et al., 2019). Em estados elevados de estresse oxidativo, a literatura informa que ocorre estímulo às vias das caspases que inativam a autofagia celular e proporcionam o processo de apoptose (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019).

Figura 4 - Esquematização dos processos de autofagia e apoptose celular desencadeados pelo estresse oxidativo.



Fonte: Olvera-Montanõ et al. (2019).

2.1.3. Abordagens terapêuticas da retinopatia diabética

Entre os tratamentos descritos para a RD, destacam-se a fotocoagulação a laser, vitrectomia, uso de anti-inflamatórios esteroides e aplicação intravítrea com anti-VEGF (DUH; SUN; STITT, 2017; FUNG et al., 2022).

O procedimento de fotocoagulação a laser ou fotocoagulação panretiniana (PRP) foca-se na cauterização dos microaneurismas e ablação dos locais sem perfusão sanguínea adequada, sendo descrito para casos de PDR e NPDR grave, sendo responsável pela redução do risco de perda visual, atuando provavelmente na redução do estímulo angiogênico e aumento da oxigenação retiniana (DUH; SUN; STITT, 2017; FUNG et al., 2022). Entretanto, mesmo com tais efeitos benéficos, essa modalidade terapêutica também pode gerar efeitos adversos, como cegueira noturna e diminuição do campo visual periférico (PEREIRA et al., 2020).

Os anti-inflamatórios esteroides também são descritos como tratamento da RD devido ao mecanismo inflamatório presente na doença. Aplicações intravítreas dessa classe de medicamentos também são descritas como eficazes na doença, levando à redução de edema e manutenção da barreira hematorretiniana. Entretanto, sua aplicação é limitada devido a efeitos colaterais como glaucoma e catarata (DUH; SUN; STITT, 2017; PEREIRA et al., 2020).

A vitrectomia é descrita principalmente para casos de hemorragia vítrea e descolamentos de retina tracional na RD (DUH; SUN; STITT, 2017). A técnica promove a eliminação de opacidades dos meios transparentes oculares e permite a correção de trações vitreoretinianas (PEREIRA et al., 2020).

Atualmente os agentes anti-VEGF são a principal categoria terapêutica estudada de maneira isolada ou em associação a outras técnicas para o controle da afecção, atuando no mecanismo fisiopatológico de desenvolvimento da doença por meio da utilização de anticorpos monoclonais contra o VEGF (FUNG et al., 2022; PEREIRA et al., 2020). Segundo estudos, esses fármacos possibilitam a regressão da neovascularização retiniana na RDP e a preservação da acuidade visual (DUH; SUN; STITT, 2017). Entretanto, ressalta-se que os estudos apontam que mesmo com a melhora da sintomatologia e gravidade da doença, a terapia anti-VEGF não alterara a isquemia retiniana subjacente devido à disfunção da barreira hematoretiniana e que os danos da retinopatia podem recorrer após a interrupção dos tratamentos. Outro fator de destaque envolve a relação de custo e eficácia desse tipo de tratamento, que ainda não foram bem avaliados (TAN; WONG, 2023).

Além dessas abordagens, o controle da hiperglicemia, hipertensão e dislipidemia são fundamentais para reduzir o desenvolvimento e a progressão da doença (FUNG et al., 2022).

2.1.4. Retinopatia diabética em outras espécies

Diferente dos humanos, na qual a RD é descrita como a principal alteração advinda da diabetes mellitus, nas demais espécies, o desenvolvimento da catarata é a complicação ocular mais d

escrita. No entanto, atualmente a literatura já evidencia a ocorrência da alteração retiniana em cães e gatos, fato que ocorre graças ao aumento da longevidade, aumento sobrevida após diagnóstico de diabetes e difusão da cirurgia de catarata em diversas regiões, já que se deve considerar que a catarata pode impedir a visualização e identificação das lesões retinianas (MCLELLAN; NARFSTROM, 2016; PETERSEN-JONES; MOWAT, 2020). Entretanto, diferente dos humanos, a doença apresenta-se de forma subclínica nos caninos, além disso, ainda não existem relatos de casos de cegueira advindo da RD na espécie (MUÑANA, 1995).

Nos caninos, a doença desenvolve-se após três a cinco anos em animais acometidos com DM, sendo que a fisiopatologia está intimamente relacionada à hiperglicemia crônica, característica essa semelhante ao que ocorre em humanos (BOSCO et al., 2005; CULLEN; WEBB, 2013; KERN; ENGERMAN, 1995). Além disso, as manifestações clínicas também não se diferenciam tanto das observadas em humanos, com a apresentação de microaneurismas, exsudatos coriorretinianas, zonas de hiper-refletividade da área tapetal, hemorragias retinianas, tortuosidade e dilatação vascular (MCLELLAN; NARFSTROM, 2016; MUÑANA, 1995). Entretanto, diferente dos humanos que podem apresentar a enfermidade em duas formas, nos

caninos domésticos a mesma só foi observada na forma não proliferativa (RDNP) (LANDRY; HERRING; PANCIERA, 2004; PETERSEN-JONES; MOWAT, 2020).

Já nos felinos, a RD foi descrita apenas experimentalmente, na qual por meio da indução da DM, também foi possível a observação da complicação ocular por meio da manifestação de microaneurismas, hemorragias retinianas, dilatação vascular e espessamento da membrana basal de capilares (CULLEN; WEBB, 2013; MUÑANA, 1995).

2.2. *Danio rerio* como modelo de doenças oftálmicas

Diversas características são apontadas como diferenciais para a utilização do zebrafish para o estudo de afecções oftálmicas, envolvendo a praticidade da espécie e suas características oculares. Dentre os pontos acerca da espécie como modelo animal, ela apresenta um manejo, manutenção e custos de obtenção relativamente fáceis e baratos quando comparados com outras espécies animais. Além disso, são altamente prolíferos, produzindo 100 a 200 oócitos por acasalamento, permitindo estudo de triagens para mutações genéticas e aplicações farmacológicas. Outra característica interessante, é o desenvolvimento rápido da espécie, tornando-se adultos com aproximadamente 4-6 meses (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014).

Já em relação aos aspectos oculares, o zebrafish se destaca de outros modelos, como os roedores, pelo seu desenvolvimento ocular rápido a partir de doze horas após a fertilização (12 hpf) e funcionalidade do sistema visual com cinco dias após a fertilização (5 dpf). Além disso, a espécie apresenta um sistema visual dominado por cones, fundamental para o estudo de afecções retinianas, principalmente as que acometem humanos (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014).

Outra característica que possibilita a utilização da espécie como modelo, trata-se das diferentes formas de avaliação do sistema ocular existentes e já testadas na espécie, como análises morfológicas, funcionais, bioquímica, moleculares e comportamentais que indicam a integridade tecidual e acuidade visual dos animais (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014).

2.2.1. Morfologia, processamento visual e desenvolvimento ocular de peixes *Danio rerio*

2.2.1.1. Estrutura morfológica ocular do zebrafish

Anatomicamente, os olhos dos zebrafish são semelhantes aos de outros vertebrados, compostos por três túnicas teciduais, no caso a túnica fibrosa, a vascular e a nervosa (JINXING; QIUSHENG; JIANHUA, 2022; MENKE et al., 2011).

A túnica fibrosa é composta pela córnea e a esclera. A córnea dos zebrafish é relativamente delgada e plana, e tanto na espécie quanto nos mamíferos apresenta cinco camadas teciduais: epitélio coreano, a membrana de Bowman, o estroma corneano, a membrana de Descemet e o endotélio corneano. Entretanto, os zebrafish possuem suas particularidades, como ausência de fibras nervosas no tecido corneano, estroma mais delgado e a presença de células de rodlet (HONG; LUO, 2021; JINXING; QIUSHENG; JIANHUA, 2022; MENKE et al., 2011). Já a esclera, semelhante aos mamíferos, é uma membrana fibrosa responsável pela conformação e proteção do bulbo ocular (JINXING; QIUSHENG; JIANHUA, 2022).

A túnica vascular, por sua vez representa tanto no zebrafish quanto nos demais vertebrados a úvea, sendo segmentada em íris e coroide, não havendo o corpo ciliar como nos mamíferos, além disso, a espécie apresenta uma estrutura denominada rede coroidal. Na espécie em questão, a íris é delgada, composta por tecido conjuntivo, melanócitos e vasos sanguíneos. A coroide, por sua vez está intimamente relacionada a esclera e a retina, sendo composta por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células pigmentares (JINXING; QIUSHENG; JIANHUA, 2022; MENKE et al., 2011). Já a rede coroidal é uma rede de capilares em contracorrente constituídos pela veia e artéria oftálmica, na qual pode estar envolvida da difusão sanguínea para os tecidos oculares, além disso, a mesma também pode possuir funções imunológicas, relacionadas a captura de antígenos (MENKE et al., 2011). Uma característica distinta do zebrafish é a existência de uma membrana prateada na junção da camada externa da coroide e da camada interna da esclera, estrutura essa que age como um tecido refletivo (JINXING; QIUSHENG; JIANHUA, 2022).

Quanto a túnica nervosa, a mesma é composta pela retina, que também assemelha-se morfológicamente aos mamíferos, também sendo composta por dez camadas teciduais, sendo elas o epitélio pigmentar da retina (EPR), a camada de fotorreceptores (CFT), a membrana limitante externa (MLE), a camada nuclear externa (CNE), a camada plexiforme externa (CPE), a camada nuclear interna (CNI), a camada plexiforme interna (CPI), a camada de células ganglionares (CCG), a camada de fibras nervosas (CFN) e a membrana limitante interna (MLI). Além disso, possuem as mesmas classes celulares neuronais, horizontais, amácrinas e da glia. Outro ponto de semelhança envolve uma área central da retina com maior proporção de cones, assemelhando-se a área centralis de mamíferos e a mácula humana (HONG; LUO, 2021; JINXING; QIUSHENG; JIANHUA, 2022).

Uma característica morfofuncional distinta da retina dos peixes zebrafish envolve sua capacidade regenerativa, fenômeno não observado em mamíferos. Tal fenômeno parece ocorrer graças as células de muller, um dos tipos de células de glia retinianas, tais células detectam

lesões teciduais e entrem no ciclo celular para sofrerem divisão assimétrica e gerarem células progenitoras multipotentes que se convertem em neurônios (GOLDMAN, 2014; GORSUCH; HYDE, 2014; MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

Outras estruturas presentes nos mamíferos e no zebrafish são o cristalino e a conjuntiva. Na espécie, o cristalino se apresenta como uma estrutura esférica, avascular e não inervada, e semelhante aos mamíferos, pode atuar na acomodação visual para a focalização dos raios luminosos na retina (JINXING; QIUSHENG; JIANHUA, 2022; MENKE et al., 2011). Já a conjuntiva, trata-se de uma membrana de tecido epitelial e conjuntivo que recobre as pálpebras e a superfície frontal do bulbo ocular, sendo um filme transparente descrito como principal órgão auxiliar do bulbo ocular (JINXING; QIUSHENG; JIANHUA, 2022).

2.2.1.2. Processamento visual do zebrafish

Quanto ao processamento visual, os mesmos também se assemelham fisiologicamente aos mamíferos, na qual a captação o estímulo luminoso pelos fotorreceptores permite a fototransdução e hiperpolarização dessas células, que desencadearam a transmissão dos sinais por meio das células bipolares até as células ganglionares, que a partir dos axônios vão formar a camada de fibras nervosas e consequentemente o nervo óptico que carreará o estímulo visual até o córtex cerebral (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014; HONG; LUO, 2021).

Como pontos diferenciais envolvendo a retina, ressalta-se que os zebrafish são uma espécie com visão tetracromática, ou seja, seus cones permitem a discriminação de quatro tipos de comprimento de ondas luminosas, sendo elas o azul, verde, vermelho e a ultravioleta. Já humanos são uma espécie tricromática, tendo cones que captam ondas azul, verde e vermelho, enquanto outros mamíferos variam, como por exemplo os mamíferos domésticos como cães e gatos que possuem visão dicromática, visualizando apenas o azul e vermelho (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014; HONG; LUO, 2021; LINK; COLLERY, 2015; ZIMMERMANN et al., 2018).

2.2.1.3. Desenvolvimento ocular do zebrafish

Os olhos dos zebrafish desenvolvem-se de maneira semelhante aos mamíferos, ou seja, formando-se a partir do neuroectoderma, ectoderma e mesênquima originada nas células da crista neural. Na qual a retina neurosensorial, epitélio pigmentar da retina e o corpo ciliar são formados a partir do neuroectoderma, o cristalino e o epitélio corneano pelo ectoderma, e o

estroma da íris, vasos sanguíneos e a esclera sendo originados do mesênquima (HONG; LUO, 2021; RICHARDSON et al., 2017).

O desenvolvimento embriológico ocular dos zebrafish ocorre de forma mais rápida quando se compara aos mamíferos. Sendo que se inicia às doze horas após a fertilização (12 hpf) e a espécie já apresenta funções visuais às setenta e duas horas após a fertilização (72 hpf) (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014; HONG; LUO, 2021). A retina por sua vez, tratando-se do tecido essencial para o início do processamento visual, se desenvolve a partir de trinta e duas horas após a fertilização (32 hpf) até os cinco dias após a fertilização (5 dpf) (CHHETRI; JACOBSON; GUEVEN, 2014).

2.2.2. *D. rerio* como modelo experimental da retinopatia diabética

O zebrafish (*D. rerio*) vem sendo usado como modelo de doenças metabólicas, entre elas, o diabetes se destaca como uma das principais investigações realizadas nessa espécie, e o mesmo ocorre com algumas complicações do diabetes, como a retinopatia diabética (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

Mesmo não sendo um modelo animal mamífero, o zebrafish vem sendo utilizado como modelo em pesquisas de retinopatia diabética devido a semelhanças que permitem investigar as alterações associadas à doença em larvas e adultos, por meio de protocolos fáceis e rápidos de condições hiperglicêmicas. Atualmente existem diversos trabalhos que demonstram a capacidade dessa espécie para modelar a angiogênese, degeneração de fotorreceptores, aumento da permeabilidade vascular e ativação das células gliais (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

Em relação ao zebrafish como modelo da RD propriamente dito, diversas formas já foram estudadas e descritas na literatura, entre elas existem os modelos induzidos e modelos genéticos de indução da doença. Os modelos induzidos envolvem a utilização de exposição à glicose, hipóxia e injeções de estreptozotocina. Já os modelos genéticos envolvem a utilização de zebrafish mutantes (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

2.2.2.1. Modelos experimentais genéticos da retinopatia diabética

Modelos genéticos de zebrafish para o estudo de doenças são mundialmente utilizados em diversas áreas de estudos, graças a técnicas como knockdown de oligonucleotídeos, nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) e o sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas (CRISPR) que permitem a

mutagênese e modelagem de doenças oculares, incluindo a retinopatia diabética (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021; RICHARDSON et al., 2017).

O peixe com mutação de *pdx1* (pancreático e duodenal homeobox 1) apresenta deficiências no desenvolvimento das ilhotas pancreáticas e consequentemente no controle da homeostase da glicose. Além disso, estudos do sistema ocular também evidenciaram que esses animais também apresentaram alterações vasculares retinianas que se assemelham a RD, incluindo constrições vasculares, tortuosidade vascular, neovascularização, expressão reduzida da proteína 1 da zônula ocular (ZO-1) e do transportador de glicose 1 (GLUT1), moléculas relacionadas a conexão das células endoteliais e regulação da permeabilidade vascular no caso da ZO-1, e da captação e absorção de glicose no sistema nervoso central pela GLUT1 (ALI et al., 2020; MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

Outro modelo de mutação *pdx1* foi desenvolvido por meio da técnica CRISPR/Cas9 no trabalho de Wigganhauser et al. (2020), identificaram os mesmos achados vasculares do modelo anterior, além disso, também identificaram alterações relacionados ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do óxido nítrico, relacionados a hiperglicemia (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

Os modelos genéticos associados a modificações nutricionais também foram desenvolvidos, como descrito por Lodd et al. (2019), que utilizaram peixes mutados por CRISPR/Cas9 no gene glioxalase 1 (*glo1*), gene associado ao catabolismo do metilglioxal (MG), que por sua vez trata-se de uma molécula relacionada a formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), associados a um protocolo de superalimentação com artêmia. Tal modelo evidenciou alterações angiogênicas na retina (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

2.2.2.2. Modelos experimentais induzidos da retinopatia diabética

A primeira metodologia desenvolvida para modelagem da doença foi descrita por Gleeson, Connaughton e Arneson (2007), por meio da exposição dos animais à glicose via água. O protocolo utiliza da alternância a cada vinte e quatro (24) horas dos animais em aquários de soluções de água e glicose 2% em água por até trinta (30) dias. Inicialmente, o modelo identificou que a exposição flutuante à glicose acarretou alterações morfométricas semelhantes às observadas em outros modelos animais e pacientes humanos diabéticos, com diminuição da espessura das camadas plexiforme e nuclear internas (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

Posteriormente, o modelo foi novamente explorado nos trabalhos de Alvarez et al. (2010) e Tanvir et al. (2018), que identificaram outras alterações associadas a RD, como o aumento do diâmetro vascular, aumento da permeabilidade vascular, espessamento de

membranas basais vasculares, degeneração de fotorreceptores identificadas morfológicamente por análises histológicas e funcionalmente por meio da eletrorretinografia (ERG), além da regulação positiva do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

A segunda metodologia desenvolvida foi a indução por hipóxia descrita por Cao et al. (2008), utilizando-se dispositivos de perfusão de gás de nitrogênio via água durante doze (12) dias. Tal metodologia, acarretou no aparecimento de efeitos vasculares relacionados a um aumento da densidade de redes capilares na retina dos animais. Outro ponto importante acerca dessa metodologia, trata-se do fato de esta ser a primeira a ser utilizada para o estudo de fármacos anti-VEGF na espécie, identificando que os modelos na espécie podem ser utilizados para o estudo dessa e de outras classes de compostos para o controle da doença (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

Em seguida, Olsen, Sarras e Intine (2010) descreveram a metodologia utilizando injeções do antibiótico estreptozotocina (STZ) por via intraperitoneal ou na nadadeira caudal. Metodologia essa que permite a observação de alterações na glicemia sanguínea e alterações morfométricas retinianas, com diminuição da espessura das camadas de fotorreceptores e plexiforme interna (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

A partir dessas três (3) metodologias iniciais, outras abordagens foram desenvolvidas variando a maturidade dos animais (adultos e larvas), tempo de indução e concentrações utilizadas (MIDDEL; HAMMES; KROLL, 2021).

2.3. Ozônio

Descoberto em meados do século XIX, o ozônio (O_3) é um gás na forma triatômica do oxigênio com uma estrutura dinamicamente instável devido à presença de estados mesoméricos (HAYASHI; FRIOLANI, 2018; SCIORSCI et al., 2020). Inicialmente, o composto foi identificado como um potente oxidante e desinfetante, que o levaram a ser uma alternativa para a cloração da água (BRAIDY et al., 2018). Posteriormente, o mesmo passou a ser utilizado em diversos estudos em diferentes áreas de medicina humana e veterinária, graças aos seus efeitos antioxidantes, estimulante da resposta imune, antimicrobianos, anti-inflamatória e no reparo tecidual (SCIORSCI et al., 2020).

2.3.1. Efeitos biológicos do ozônio

Para fins medicinais, o ozônio pode ser aplicado por diferentes vias, na qual reage com as moléculas presentes nos líquidos orgânicos que atuaram como doadores de elétrons e sofrem

o processo de oxidação, como os compostos tiol com grupos - SH como a albumina, glutathione e cisteína, ácidos graxos poli-insaturados, antioxidantes como o ácido ascórbico e úrico, e dependendo da dosagem utilizada com carboidratos, enzimas e ácidos ribonucleicos (RNA). As interações com essas biomoléculas levam a formação simultânea de espécies reativas de oxigênio (EROs) e produtos oxidantes lipídicos (POLs), moléculas essas que vão desempenhar os efeitos biológicos do composto (BOCCI, 2004; HAYASHI; FRIOLANI, 2018; SCIORSCI et al., 2020; SMITH et al., 2017).

Quanto aos EROs, atualmente sabe-se que a principal molécula formada a partir da utilização do O_3 é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um oxidante não radical que atua como um mensageiro que estimula diferentes efeitos biológicos, como o aumento da formação de energia e o transporte de oxigênio para o interior das células, ativação e estímulo da síntese de interleucinas e citocinas, aumento da liberação de autocóides e fatores de crescimento, entre outros (BOCCI, 2004; HAYASHI; FRIOLANI, 2018). Entretanto, deve-se atentar ao excesso de EROs que pode ser formado, já que os mesmos podem estimular a formação de compostos tóxicos ao organismo, entre eles o peroxinitrito e o ânion hipoclorito (BOCCI, 2004).

Já as POLs são moléculas mais estáveis e possuem maior difusão, tendo efeitos benéficos ou tóxicos dependendo de sua concentração. São compostos formados a partir da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, e podem ser classificados em diferentes classes: como radicais alcoxi (LO), lipoperóxidos (LOO), lipoproperanos (LOOH), isoprostanos e alcenais, como o 4-hidroxinoneal (4-HNE) e o malondialdeído (MDA). Após a formação desses compostos, os efeitos benéficos ocorrem em baixas concentrações, na qual as reações com as POL podem acarretar em um processo oxidativo agudo, sinalizando ao organismo sobre outro estresse oxidativo existente, e estimulando mecanismos antioxidantes, como a liberação de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione-reductase, glutathione-peroxidase e catalase, além de proteínas de estresse oxidativo como a heme-oxigenase I (HSP-32) (BOCCI, 2004; HAYASHI; FRIOLANI, 2018). Ressalta-se que, além dos efeitos benéficos observados, esses compostos são altamente tóxicos em elevadas concentrações (BOCCI, 2004).

Em elevadas concentrações as EROs e POLs podem desencadear efeitos adversos devido à sobrecarga do sistema antioxidante, resultando em alterações teciduais, desencadeadas por perdas oxidativas de grupos funcionais e biomoléculas, como enzimas, e alterações da permeabilidade e funções das membranas celulares (SCIORSCI et al., 2020).

2.3.1.1. Efeitos de oxigenação

Em relação à oxigenação tecidual, a literatura descreve o aumento dessa característica graças ao potencial do O_3 em aumentar o ATP dos eritrócitos a partir do aumento da carbonização oxidativa do piruvato utilizado no ciclo de Krebs, além disso, o mesmo aumentar as taxas de glicólise dessas células, estimulando o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), proporcionando um aumento do transporte de oxigênio pelos eritrócitos e redução da afinidade da hemoglobina ao oxigênio (O_2), consequentemente, induzindo a uma maior liberação de O_2 aos tecidos (ELVIS; EKTA, 2011; LIU et al., 2023).

2.3.1.2. Efeitos antioxidantes

Em relação ao mecanismo antioxidante, após a promoção da formação do H_2O_2 e do 4-HNE, os mesmos estimulam indiretamente a via do fator nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2), composto que no núcleo das células teciduais leva a transcrição de elementos de resposta antioxidante, na qual desencadeara na elevação da expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), heme oxigenase-1 (HO-1), NADPH-quinona-oxidorredutase (NQO-1) e proteínas de choque térmico (HSPs), moléculas essas que vão atuar na regulação do equilíbrio redox do organismo e evitar ou controlar os estados de estresse oxidativo (LIU et al., 2023; SMITH et al., 2017).

Além do aumento nos níveis de moléculas antioxidantes, o O_3 também atua sobre as mitocôndrias, que podem estar disfuncionais e produzindo em excesso as EROs e posteriormente a processos de autofagia mitocondrial e celular. Nesses casos, sugere-se que o ozônio, por meio da promoção da sinalização Nrf2 diminua o dano mitocondrial e promova a sua reparação, além disso, o composto promove o aumento das cristas mitocondriais, elevando a função e diminuindo o processo de autofagia da organela (LIU et al., 2023). Esse efeito de diminuição da autofagia mitocondrial já foi reforçado em estudos com ozônio na qual se observou diminuição de proteínas associadas a microtúbulos 1 de cadeia leve 3 (LC3) e da quinase putativa 1 induzida por PTEN (PINK1), moléculas essas associadas a formação ao autofagossomos e danos mitocondriais respectivamente (BARODIA; CREED; GOLDBERG, 2017; LIU et al., 2023).

2.3.1.3. Efeitos imunológicos

Quanto aos efeitos imunológicos relacionados a aplicação do O_3 , segundo a literatura eles estão relacionados ao estímulo ao aumento de leucócitos, desencadeamento de processos

de citotoxicidade celular (ADCC) e regulação de processos inflamatórios (LIU et al., 2023; SCIORSCI et al., 2020).

Em relação aos processos inflamatórios, a literatura descreve a atuação do ozônio por meio inibição da via do fator nuclear $\kappa B-\alpha$ ($NF\kappa B-\alpha$), via essa que pode ser ativada por lipopolissacarídeos (LPS), citocinas pró-inflamatória como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e as interleucinas 6 e 17, além de fatores físicos e químicos. Após sua ativação, essa via estimula a produção de moléculas pró-inflamatórias, como o óxido nítrico induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2), $TNF-\alpha$, interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1β (IL- 1β), desencadeando quadros inflamatórios e danos teciduais (LIU et al., 2023; MANOTO; MAEPA; MOTAUNG, 2018). Ressalta-se que dosagem altas do O_3 podem ter o efeito inverso, e promover os processos inflamatórios por meio da mesma via (LIU et al., 2023).

2.3.1.4. Efeitos cicatrizantes

Em relação aos processos cicatriciais, sabe-se que o ozônio atua sobre as fases de cicatrização, sendo elas a hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Na fase de homeostasia, ocorre ativação plaquetária que atuam na formação de redes de fibrinas para interrupção de perdas sanguíneas nos leitos lesionados em questão de minutos, propriedade essa estimulada pelo uso do O_3 , pois o composto estimula a agregação plaquetária (LIU et al., 2023; VALACCHI; BOCCI, 2000). Quanto a fase de inflamação, a mesma é caracterizada pelo desenvolvimento de um infiltrado leucocitário no leito lesionado, com a presença principalmente de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, para a eliminação de possíveis micro-organismos oportunistas e eliminação de células lesionadas. Nesse sentido, devido aos efeitos imunológicos proporcionados pelo ozônio, ocorre regulação dos leucócitos e macrófagos, proporcionando um processo inflamatório adequado e controlado para um processo cicatricial eficiente (KIM et al., 2009; LIU et al., 2023).

Já na fase de proliferação, ocorre a proliferação e migração celular para formação de um adequado tecido de granulação e posterior epitelização do leito lesado. Nesta fase, o composto parece atuar por meio da regulação do fator induzido por hipóxia 1 alfa ($HIF-1 \alpha$), pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e pelo fator de crescimento transformador beta ($TGF-\beta$). Em relação a essas moléculas, atribui-se ao VEGF o papel de neovascularização tecidual, que pode ser induzida diretamente pelos H_2O_2 formados pelo ozônio, ou indiretamente pelo estímulo advindo do $HIF-1$. Quanto ao $TGF-\beta$, o mesmo atua na regulação da transição epitelial-mesenquimal (EMT), processo no qual ocorre diferenciação de células epiteliais em

mesenquimais para o processo cicatricial, processo esse também estimulado pelo O_3 por meio da via de sinalização intracelular (PI3K/Akt/mTOR). Além disso, o O_3 também afeta positivamente os fibroblastos, estimulando sua proliferação e migração por meio da atuação sobre a proteína α -SMA e o colágeno tipo I (LIU et al., 2023; XIAO et al., 2017; XIAO; WU; BI, 2021).

2.3.1.5. Efeitos antimicrobianos

Outra atuação do composto envolve os efeitos antimicrobianos contra bactérias, fungos e vírus (LIU et al., 2023; SCIORSCI et al., 2020). Em relação às bactérias, o ozônio é descrito como um composto de amplo espectro, com efeitos bacteriostáticos e bactericidas. Tais efeitos são proporcionados devido à alta atividade oxidativa desencadeada pelos EROs e pelo próprio O_3 , que oxida glicoproteínas, lipoproteínas e glicolipídeos das membranas celulares bacterianas, além de afetar funções enzimáticas e danificar moléculas de RNA e DNA. Tais modificações afetam o metabolismo, processo reprodutivo e sobrevivência bacteriana (ELVIS; EKTA, 2011; LIU et al., 2023; SCIORSCI et al., 2020).

Quanto aos fungos, a literatura descreve que o O_3 é um potencial composto antifúngico, entretanto, seu mecanismo de ação sobre esses tipos de microrganismos ainda precisa ser mais bem elucidado. Atualmente, sabe-se que o composto promove inibição da produção de ureases, amilases, fosfatase alcalina, lipases e queratinas fúngicas, além disso, o mesmo aumenta a perda de nutrientes e interrompe as funções fúngicas (ELVIS; EKTA, 2011; LIU et al., 2023). Ressalta-se que o composto também tem efeito sobre as micotoxinas, atuando sobre as ligações das moléculas e interferindo na toxicidade (LIU et al., 2023).

Já nos vírus, já foi evidenciado que o O_3 atua na inibição da replicação viral e na sobrevivência viral, por meio da danificação de lipídeos e de proteínas do capsídeo viral e do RNA (ELVIS; EKTA, 2011; LIU et al., 2023; SCIORSCI et al., 2020). Além disso, o ozônio demonstra efeito modulador da via do inflamassoma 3 (NLRP3), que estimula citosina como as interleucinas 1β (IL- 1β) e 18 (IL-18), que atuam nas infecções virais e em processos inflamatórios (LIU et al., 2023).

2.3.2. Uso do ozônio na retinopatia diabética

O ozônio já vem sendo utilizado em pesquisas acerca do diabetes há alguns anos, demonstrando efeitos benéficos na doença em si e de suas complicações, como a neuropatia diabética, do pé diabético e doenças arteriais periféricas (BRAIDY et al., 2018).

No caso da retinopatia diabética, estudos que envolvem a utilização do O₃ na enfermidade são um campo recente nas pesquisas científicas, iniciando-se em 2016 em pesquisas com roedores. No primeiro estudo de Liu (2016), os animais foram condicionados a RD a partir de alimentação e aplicação intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), posteriormente, os animais do grupo tratado foram submetidos a enemas de gás de ozônio, metodologia essa que possibilitou a identificação que o comportamento teve efeitos benéficos no controle da enfermidade quando comparados aos grupo controle sem tratamento, por meio da redução do número de apoptose celular em células retinianas, redução de moléculas relacionadas a lesões nervosas retinianas como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), N-metil D-aspartato subtipo 2B (NR2B), proteínas quinases (ERK1 e ERK2) e receptor de proteínas Nogo (NgR), redução do estresse do retículo endoplasmático com diminuição da ativação do fator de transcrição ATF6, proteína 1 de ligação à caixa X (XBP1), proteína quinase semelhante ao RNA do retículo endoplasmático (PERK), enzima tipo 1 que requer inositol (IRE1- α) e do fator de iniciação eucariótica 2 (eIF2 α), além disso, também proporcionou inibição da angiogênese a partir da redução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de transcrição ativado por tirosinas quinases (STAT3), fator induzido por hipóxia (HIF-1 α), apelina e receptor acoplado à proteína G APJ.

Já no segundo trabalho de Xie et al. (2016), os animais também foram induzidos a RD pela alimentação e aplicação de STZ, e tratados com enema de gás de ozônio. Evidenciando também efeitos benéficos no controle da doença com redução da angiogênese por inibição da liberação do VEGF, além disso, esse trabalho também evidenciou uma regulação do processo inflamatório a partir da redução de mediadores inflamatórios como a interleucina 1B (IL-1b), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo é avaliar os efeitos da utilização do ozônio no modelo de retinopatia diabética em zebrafish.

3.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos, o trabalho tem enfoque nos seguintes pontos:

- Avaliar se a aplicação do ozônio via água pode ser detectada indiretamente pela mensuração do potencial de oxirredução (ORP);
- Avaliar se a exposição ao ozônio desencadeia alterações morfológicas e morfométricas no tecido retiniano de peixes zebrafish adultos sadios;
- Avaliar o efeito do ozônio sobre a morfologia e morfometria das brânquias de peixes zebrafish adultos sadios;
- Avaliar se a mensuração da glicemia sanguínea e proteínas glicadas do olho determinam o estado hiperglicêmico característico da retinopatia diabética no modelo zebrafish;
- Avaliar o efeito do ozônio na morfologia e morfometria retiniana de peixes zebrafish adultos durante o desenvolvimento da retinopatia diabética, por meio de técnicas morfológicas e morfométricas;
- Avaliar o efeito da exposição ao ozônio sobre o estresse oxidativo do tecido ocular de peixes zebrafish adultos sadios e induzidos para a doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Declaração de ética

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram conduzidos em estrita conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob nº 033/23 e atende às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório.

4.2. Modelo animal

Foram utilizados 570 animais adultos zebrafish (*D. rerio*) de ambos os sexos, com idade de 6 a 12 meses, advindos e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os animais foram aclimatados a condições laboratoriais constantes em aquários específicos para a espécie de três litros, em sistema isolado contendo água de tratada a partir dos filtros de carvão ativado, bioballs e filtros bag do sistema de rack hydrus para zebrafish (Alesco®, Brasil), fotoperíodo (12 horas de luz e 12 de escuro), temperatura (28 °C) e dieta com ração comercial floculada (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil).

4.3. Ensaios experimentais

4.3.1. Ensaio 1: Avaliação dos efeitos do ozônio sobre o tecido retiniano e branquial em zebrafish

Ao longo de 15 dias, 120 animais foram divididos em 15 aquários contendo oito animais cada. Posteriormente, eles foram aleatoriamente divididos em cinco grupos com 24 animais cada (três repetições por grupo), sendo um grupo controle e quatro tratados com ozônio a cada 48 horas, nas concentrações de 0,052 mg/L (52 µg/ml) ou 0,072 mg/L (72 µg/ml), uma ou duas vezes ao dia, conforme evidenciado na tabela 1.

Tabela 1 - Identificação e descrição dos grupos experimentais do ensaio 1.

Grupos experimentais	
Grupo controle (GC)	Grupo de aquários que permaneceram em água e não receberam ozonização.
Grupo ozônio 1 (O1)	Grupo de aquários que a água foi ozonizada a cada 48 horas, na concentração de 52 µg/ml, uma vez ao dia.
Grupo ozônio 2 (O2)	Grupo de aquários que a água foi ozonizada a cada 48 horas, na concentração de 52 µg/ml, duas vezes ao dia.
Grupo ozônio 3 (O3)	Grupo de aquários que a água foi ozonizada a cada 48 horas, na concentração de 72 µg/ml, uma vez ao dia.
Grupo ozônio 4 (O4)	Grupo de aquários que a água foi ozonizada a cada 48 horas, na concentração de 72 µg/ml, duas vezes ao dia.

Fonte: Autor (2024).

Após os quinze dias do experimento, todos os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com 250 mg/L de triclaína em água.

4.3.2. Ensaio 2: Uso do ozônio durante o desenvolvimento da retinopatia diabética no modelo Zebrafish

Ao longo de 30 dias, 450 animais (zebrafish adultos) foram divididos em 30 aquários contendo 15 animais cada, posteriormente, os peixes foram aleatoriamente divididos em seis grupos com 75 animais cada (cada grupo possuía cinco repetições), sendo dois grupos controles e quatro testados com ozônio a cada 48 horas, nas concentrações de 0,052 mg/L (52 µg/ml) ou

0,072 mg/L (72 µg/ml), uma ou duas vezes ao dia, utilizadas no ensaio 1 e baseadas no trabalho de Monteiro (2022), conforme evidenciado na tabela 2.

Tabela 2 - Identificação e descrição dos grupos experimentais do ensaio 2.

Grupos experimentais	
Grupo Controle negativo (CN)	Grupo de aquários que permaneceram apenas em água durante o experimento, não receberam ozonização e nem foram submetidos ao protocolo de indução hiperglicêmica para a doença
Grupo controle positivo (CP)	Grupo de aquários que foi submetido apenas ao protocolo de indução hiperglicêmica para a doença
Grupo teste 1 (T1)	Grupo de aquários induzidos para a doença e que a água foi ozonizada a cada 48 horas, na concentração de 52 µg/ml, uma vez ao dia
Grupo teste 2 (T2)	Grupo de aquários induzidos para a doença e que a água foi ozonizada a cada 48 horas, na concentração de 52 µg/ml, duas vezes ao dia
Grupo teste 3 (T3)	Grupo de aquários induzidos para a doença e que a água foi ozonizada a cada 48 horas, na concentração de 72 µg/ml, uma vez ao dia
Grupo teste 4 (T4)	Grupo de aquários induzidos para a doença e que a água foi ozonizada a cada 48 horas, na concentração de 72 µg/ml, duas vezes ao dia

Fonte: Autor (2025).

Após os trinta dias do experimento, todos os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com 250 mg/L de triclaína em água.

4.3.2.1. Protocolo de exposição experimental do ensaio 2

Para a indução hiperglicêmica da retinopatia, foi realizado o protocolo desenvolvido por Gleeson, Connaughton e Arneson (2007), na qual os peixes foram expostos a soluções de glicose 2% em água e apenas água a cada 24 horas (ou seja, era feita a mudança na composição da solução dos aquários desses grupos a cada 24 horas) durante 30 dias, protocolo esse realizado no grupo CP. Nos grupos testes (T1, T2, T3 e T4), essa metodologia foi adaptada para utilização dos protocolos de tratamento experimentais com ozônio via água, dessa forma, a partir do 16º dia do protocolo, foi implementado a administração de ozônio na água nos dias na qual os animais seriam expostos apenas a água (ou seja, os animais foram expostos a soluções de

glicose 2% em água e apenas água a cada 24 horas durante os 15 primeiros dias, posteriormente, nos 15 dias restantes os mesmos foram expostos a soluções com glicose 2% em água e água submetidas a aplicação de ozônio a cada 24 horas). Os animais do CN foram expostos apenas a água durante os 30 dias, sendo submetidos apenas a renovação da água a cada 24 horas.

4.3.3. Ozonização da água dos aquários experimentais

Baseando-se no protocolo descrito por Monteiro (2022), os aquários dos grupos do tratamento de ambos os ensaios, foram submetidos a ozonização da água por dez minutos por meio do ozonizador medicinal (Ozone & Life®, modelo 1.5 RM) a cada 48 horas, variando a concentração (52 µg/ml ou 72 µg/ml) e a frequência de ozonização (uma ou duas vezes ao dia), com horários fixos para aplicação (9h e 16h) e inserção da saída do O₃ dentro do aquário, imersa na água até a profundidade, de forma uniforme para todos os grupos tratados.

As concentrações de ozônio utilizadas foram calculadas com base na tabela de concentração fornecida pelo fabricante, relacionada com a vazão de oxigênio do cilindro, conforme evidenciado na tabela 3.

Tabela 3 - Tabela de concentração do ozônio fornecida pelo fabricante.

Vazão de oxigênio (O ₂)	Dosador										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1,0 L/min	0	1	2	3	4	6	8	10	12	15	17
0,75 L/min	0	1,5	3	4	5	8	10	13	16	19	21
0,5 L/min	0	2	5	6	8	12	15	19	22	27	29
0,25 L/min	0	4	10	13	16	22	28	34	40	47	51
0,125 L/min	0	9	20	26	32	43	52	61	65	69	72

Fonte: Ozone & Life, modelo 1.5 RM.

4.4. Técnicas avaliativas

4.4.1. Mensuração do potencial de oxirredução

As variações entre os níveis médios do ORP nos três tempos ao longo dos oito dias de aplicação foram calculadas e os valores médios obtidos foram tabulados para comparação entre os grupos, sendo esses tempos: anteriormente à aplicação do ozônio (T1), imediatamente após a aplicação (T2) e dez minutos após a aplicação (T3). A avaliação do aumento ou redução, foi realizada por meio de dois deltas: delta 1 ($\Delta 1$) referente a diferença entre o parâmetro antes e

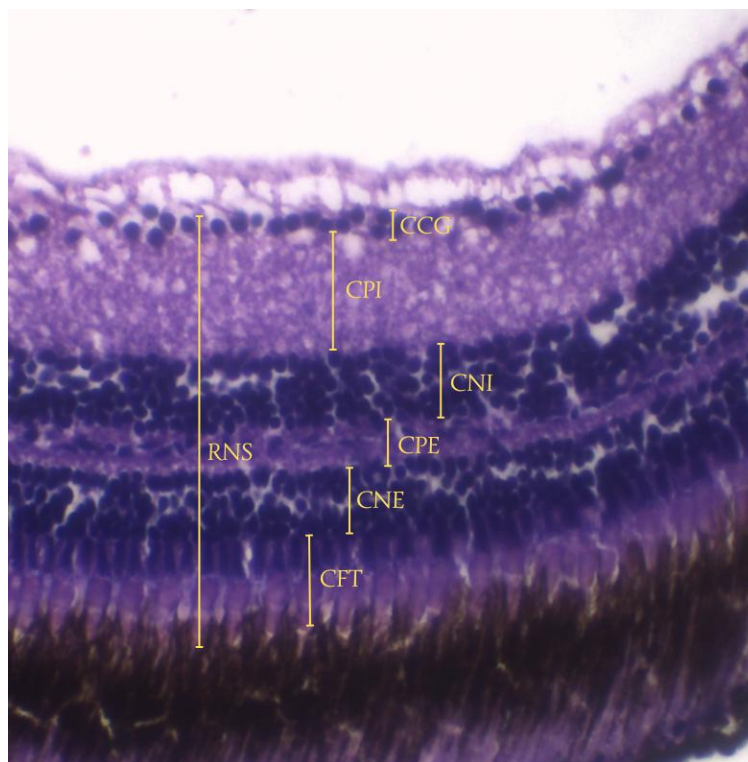
imediatamente após a aplicação do O₃, ou seja, $\Delta 1 = T2-T1$, e delta 2 ($\Delta 2$) referente a diferença entre o parâmetro antes e dez minutos após a aplicação do O₃, ou seja, $\Delta 2 = T3-T1$.

4.4.2. Processamento e análises morfológicas dos olhos

Após a eutanásia, três animais de cada repetição do ensaio 1 (nove animais por grupo experimental) e cinco animais de cada repetição do ensaio 2 (25 animais por grupo experimental) foram submetidos a enucleação de ambos os olhos por meio do auxílio de uma pinça colibri 0,3. Posteriormente, os olhos foram fixados em recipientes contendo formalina tamponada a 10% por 48 horas, em seguida, eles foram acondicionados em álcool 70% para posterior processamento em diferentes concentrações de álcoois (80%, 90% e 100%), xilol e parafina. Após esses procedimentos, as amostras foram incluídas em blocos de parafina, e submetidas a secção longitudinal de 3-5 μ m para confecção das lâminas histológicas. As lâminas confeccionadas foram submetidas a remoção da parafina e coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

Para avaliação da morfologia retiniana, as lâminas foram visualizadas em 40x utilizando um microscópio (Olympus, modelo CX22LEDDRFS1, Tóquio, Japão), fotografadas por meio do sistema de captura e análise de imagem Software Motic Images Plus 2.2 (Motic®). Em seguida para a análise morfométrica as amostras foram submetidas a mensuração aproximada da espessura da retina neurosensorial (RNS), camada de fotorreceptores (CFT), camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI) e camada de células ganglionares (CCG) por meio do software ImageJ®, conforme demonstrado na figura 5. Foram realizadas três medidas de cada parâmetro e a média desses valores foi calculada para cada animal e posteriormente foram utilizadas pelas análises estatísticas (TANVIR et al., 2018).

Figura 5 - Imagem histológica da retina neurosensorial (RNS), camada de fotorreceptores (CFT), camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI) e camada de células ganglionares (CCG) avaliadas no experimento.



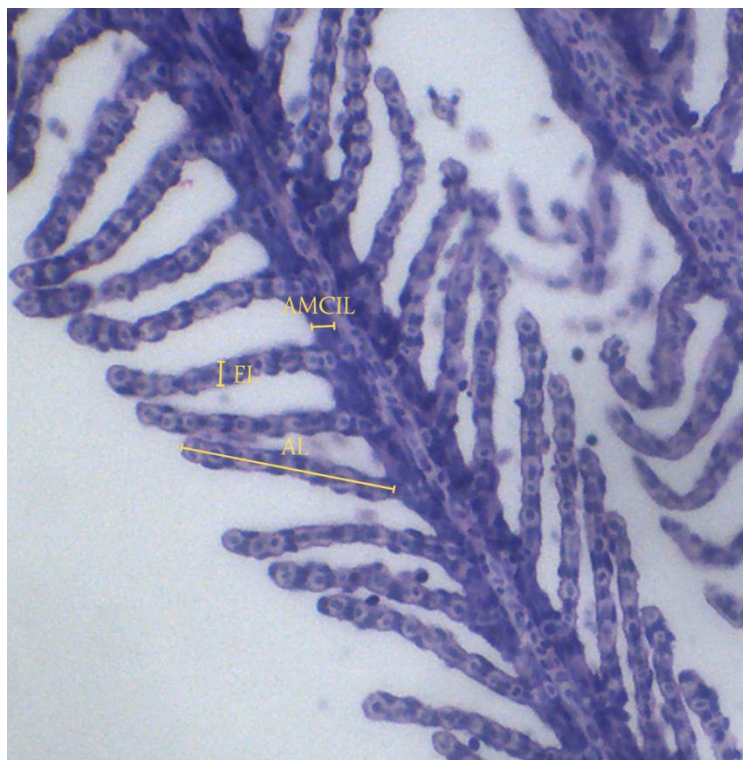
Fonte: Autor (2025).

4.4.3. Processamento e análises morfológicas das brânquias

Após o procedimento de eutanásia, cinco animais de cada repetição do ensaio 1 (15 animais por grupo experimental) foram submetidos a dissecação das brânquias por meio do auxílio de uma pinça colibri 0,3 e tesoura de conjuntiva delicada. Posteriormente, as brânquias foram fixadas em recipientes contendo formalina tamponada a 10% por 48 horas, em seguida, os mesmos foram acondicionados em álcool 70% para posterior processamento em diferentes concentrações de álcoois (80%, 90% e 100%), xilol e parafina. Após esses procedimentos, as amostras foram incluídas em blocos de parafina, e submetidas a secção longitudinal de 3-5 μm em micrótomo para confecção das lâminas histológicas. As lâminas confeccionadas foram submetidas a remoção da parafina e submetidas a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

Para avaliação da morfologia branquial, as lâminas foram visualizadas em 40x utilizando um microscópio (Olympus, modelo CX22LEDDRFS1, Tóquio, Japão), fotografadas por meio do sistema de captura e análise de imagem Software Motic Images Plus 2.2 (Motic®). Em seguida para a análise morfométrica as amostras foram submetidas a mensuração da altura da massa celular interlamelar (AMCI), espessura (EL) e altura lamelar (AL) por meio do software ImageJ®, conforme a figura 6. Foram realizadas cinco medições de cada parâmetro por peixe e a média desses valores foi calculada para cada animal e posteriormente foram utilizadas pelas análises estatísticas (PLATEK et al., 2017).

Figura 6 - Imagem histológica branquial com identificação da massa celular interlamelar (AMCI), espessura (EL) e altura lamelar (AL) avaliadas no experimento.



Fonte: Autor (2025).

4.4.4. Mensuração das proteínas glicadas e do efeito oxidativo nos olhos

Cinco animais de cada repetição de ambos os ensaios (15 e 25 animais por grupo experimental dos ensaios 1 e 2, respectivamente) foram submetidos a enucleação de ambos os olhos por meio do auxílio de uma pinça colibri 0,3. Posteriormente, os olhos foram acondicionados em 500 μ L de solução tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) e homogeneizados, posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5500 rotações por minuto (rpm) a 4°C por meio de uma centrífuga (Thermo Fisher Scientific, Modelo D-37520, Alemanha). Em seguida, o sobrenadante das amostras foi coletado e armazenadas em microtubos estéreis, para congelamento a -80°C. Posteriormente, essas amostras homogeneizadas foram utilizadas para análise das proteínas glicadas, espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas antioxidantes dos olhos.

4.4.4.1. Análise das proteínas glicadas nos olhos

Baseando-se na determinação de proteínas glicadas em olhos de zebrafish descritas por Capiotti et al. (2014), adaptou-se essa metodologia para realização do ensaio de quantificação de frutossamina baseado em enzima (Frutossamina K135-4, Bioclin®), para documentar a presença de produtos de glicação não enzimática de olhos de zebrafish de todos os grupos do

ensaio 2. Seguindo as instruções do fabricante, foram adicionados de forma triplicada 8 µl do sobrenadante das amostras de cada repetição em uma microplaca com 96 poços, em seguida, foram adicionadas a 150 µl de tampão carbonato e 50 µl de azul de nitrotetrazolio. A placa foi então incubada em estufa por 10 min a 37 °C, protegida da luz. A quantificação da frutossamina foi determinada por meio do espectrofotômetro (Tecan®, Infinite 200 Pro, Suíça) a 546 nm e a concentração foi expressa em µmol/l. As absorbâncias médias das triplicatas foram tabuladas e utilizadas para as análises estatísticas.

4.4.4.2. Análise das espécies reativas de oxigênio dos olhos

Para a quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) dos olhos de ambos os ensaios, adaptou-se a metodologia de Driver, Kodavanti e Mundy (2000), na qual 20 µl das amostras homogeneizadas foram pipetadas, em duplicata, em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados a cada poço 80 µl de tampão fosfato 50 mM (pH 7,2) contendo diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) em uma concentração final de 10 µM. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos em uma estufa, protegida da luz. Na presença de EROs, o DCFH-DA é convertido em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto fluorescente. A fluorescência do DCF foi detectada por meio do espectrofotômetro (Tecan®, Infinite 200 Pro, Suíça) em comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/530 nm. O conteúdo de EROs foi quantificado usando uma curva padrão de DCF, com resultados expressos como pmol de DCF formado por mg de proteína por minuto.

4.4.4.3. Análise da atividade das enzimas antioxidantes dos olhos

Para a quantificação da atividade antioxidante dos olhos, foram realizadas a mensuração das atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST). Para o cálculo da atividade dessas enzimas, as concentrações de proteína nas amostras também foram determinadas utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Adaptando o método de Aebi (1984), a atividade da CAT foi analisada por meio da adição de 6 µl das amostras homogeneizadas em duplicata, em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados a cada poço 135 µl de solução tampão (pH 7) e 135 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30 mM. Posteriormente, a diminuição da absorbância foi medida a 240 nm por 2 minutos por meio do espectrofotômetro (Tecan®, Infinite 200 Pro, Suíça). A atividade da enzima foi estimada utilizando-se do coeficiente de extinção molar (ε)

de H_2O_2 ($43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados são expressos como μmol de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por mg de proteína.

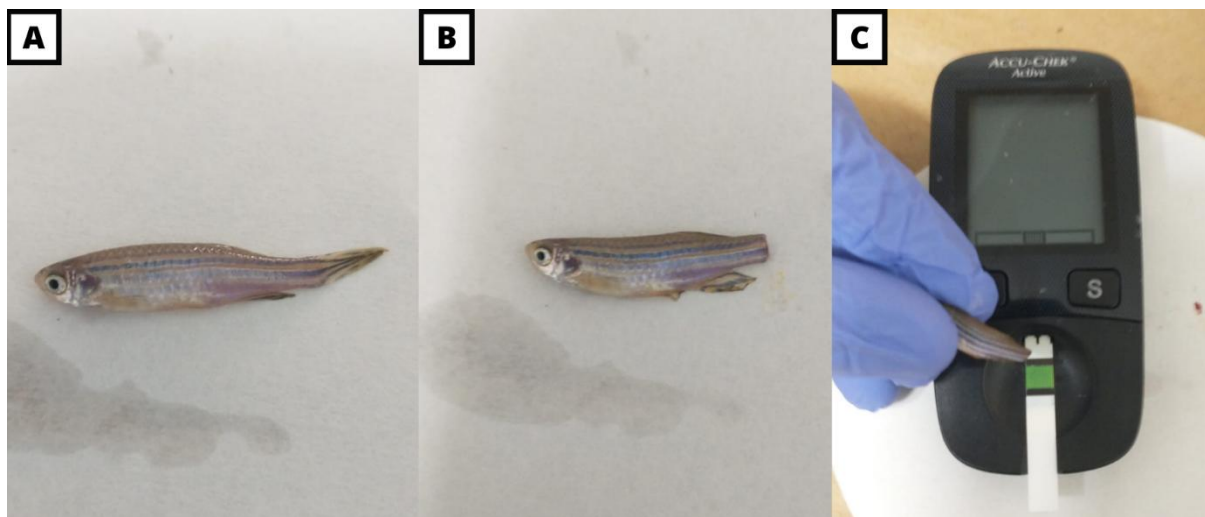
A atividade da enzima SOD foi determinada adaptando-se o método de Beauchamp e Fridovich (1971), no qual $30 \mu\text{l}$ das amostras homogeneizadas foram pipetadas, em duplicata, em uma microplaca com 96 poços. Em seguida, foram adicionados a cada poço $170 \mu\text{l}$ da solução de ensaio enzimático contendo $100 \mu\text{l}$ de PBS (100 mM , $\text{pH } 7,8$), $2 \mu\text{l}$ de EDTA (10 mM), $40 \mu\text{l}$ de metionina, $11 \mu\text{l}$ de água ultrapura e $15 \mu\text{l}$ de azul de nitrotetrazólio (NBT, 1 mM). Posteriormente, a placa foi analisada por meio do espectrofotômetro (Tecan®, Infinite 200 Pro, Suíça) a 560 nm . Uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da taxa de fotorredução do NBT, com resultados expressos como unidades de SOD por mg de proteína (SONG et al., 2009).

Quanto a GST, sua atividade foi mensurada adaptando-se o método de (HABIG; JAKOBY, 1981), na qual $5\text{-}15 \mu\text{l}$ da amostra homogeneizada, $50 \mu\text{l}$ de glutathione-GSH reduzida (25 mM) e $180 \mu\text{l}$ (1 mM) de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (dissolvido em etanol 96% e diluído com fosfato de sódio $0,1 \text{ M}$ tampão, $\text{pH } 7,2$) foram adicionados a placas de 96 poços. A formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno foi medida monitorizando a taxa de aumento da absorbância a 340 nm durante 3 min utilizando um espectrofotômetro. A atividade da glutathione S-transferase foi estimada, em triplicata, usando $\epsilon = 9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ com base na produção de conjugado CDNB por minuto por mg de proteína. Os resultados são relatados como unidades por mg de proteína.

4.4.5. Mensuração de glicemia

Semelhante ao descrito por Capiotti et al. (2014), após o procedimento de eutanásia, cinco animais de cada repetição do ensaio 2 (25 animais por grupo experimental) foram secos e submetidos a secção da nadadeira caudal para coleta de sangue via veia caudal utilizando uma lâmina de bisturi número 15. Imediatamente após o corte, o sangue era colocado em tiras do glicosímetro Accu-Chek Active®, para mensuração dos níveis de glicose sanguínea, conforme demonstrado na figura 7.

Figura 7 - Mensuração da glicemia sanguínea dos zebrafish. A. Animal seco sobre papel filme. B. Secção da nadadeira caudal para coleta de sangue. C. Aplicação do sangue coletado a partir da nadadeira caudal seccionada na tira do glicosímetro glicosímetro Accu-Chek Active®.



Fonte: Autor (2025).

4.5. Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados utilizando o software Jamovi®, avaliando-se inicialmente os pressupostos de normalidade por meio do teste de Shapiro Wilk e de homogeneidade da variância por meio do teste de Levene. Quando a suposição de normalidade não foi atendida, foi realizada a normalização dos dados por meio da transformação dos valores. Quando a suposição de normalidade foi atendida ou os dados foram submetidos a normalização, foi realizada análise de variância via ANOVA a um fator, por meio do teste de Fisher (variâncias homogêneas) ou de Welch (variâncias heterogêneas), e posteriormente, as diferenças significativas foram determinadas pelo teste post-hoc de Tukey (variâncias homogêneas) ou de Games-Howell (variâncias heterogêneas) a 5% de significância. Posteriormente, os achados significativos sobre parâmetros que envolveram os animais foram submetidos a análise da dimensão de efeito por meio do teste de d de Cohen e interpretação proposta por Sawilowsky (2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

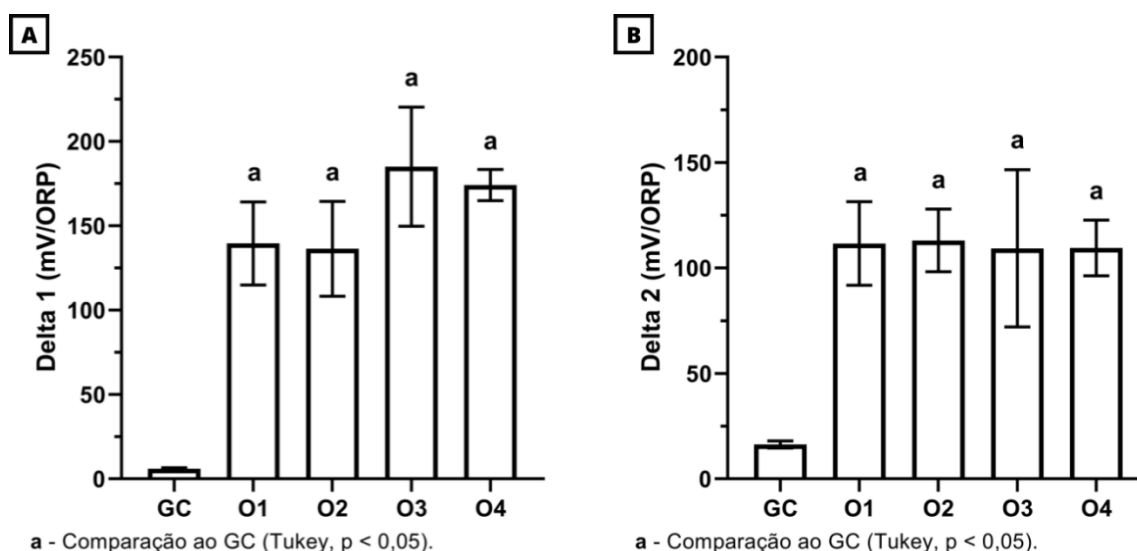
5.1. Ensaio 1: Avaliação dos efeitos do ozônio sobre o tecido retiniano e branquial em Zebrafish

5.1.1. Mensuração do potencial de oxirredução

O ORP apresentou níveis médios no delta 1 de $5,95 \pm 0,65$ mV no grupo controle, $139,56 \pm 24,59$ mV no O1, $136,37 \pm 28,14$ mV no O2, $185,10 \pm 35,34$ mV no O3 e $174,19 \pm 9,23$ mV no O4. Já no delta 2, foram observados de $16,31 \pm 1,66$ mV no grupo controle, $111,63 \pm 19,84$ mV no O1, $113,06 \pm 14,82$ mV no O2, $109,30 \pm 37,29$ mV no O3 e $109,51 \pm 13,24$ mV no O4,

conforme demonstrado na figura 8. Dessa forma, evidenciou-se um aumento significativo (Tukey, $p < 0,05$) do ORP de todos os grupos tratados com ozônio em relação ao controle no delta 1 e 2. Além disso, não foram encontrados resultados significativos (Tukey, $p > 0,05$) em comparação entre os grupos submetidos a aplicação do ozônio via água.

Figura 8 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão dos níveis de ORP calculados nos deltas do ensaio 1. A. Delta 1. B. Delta 2.



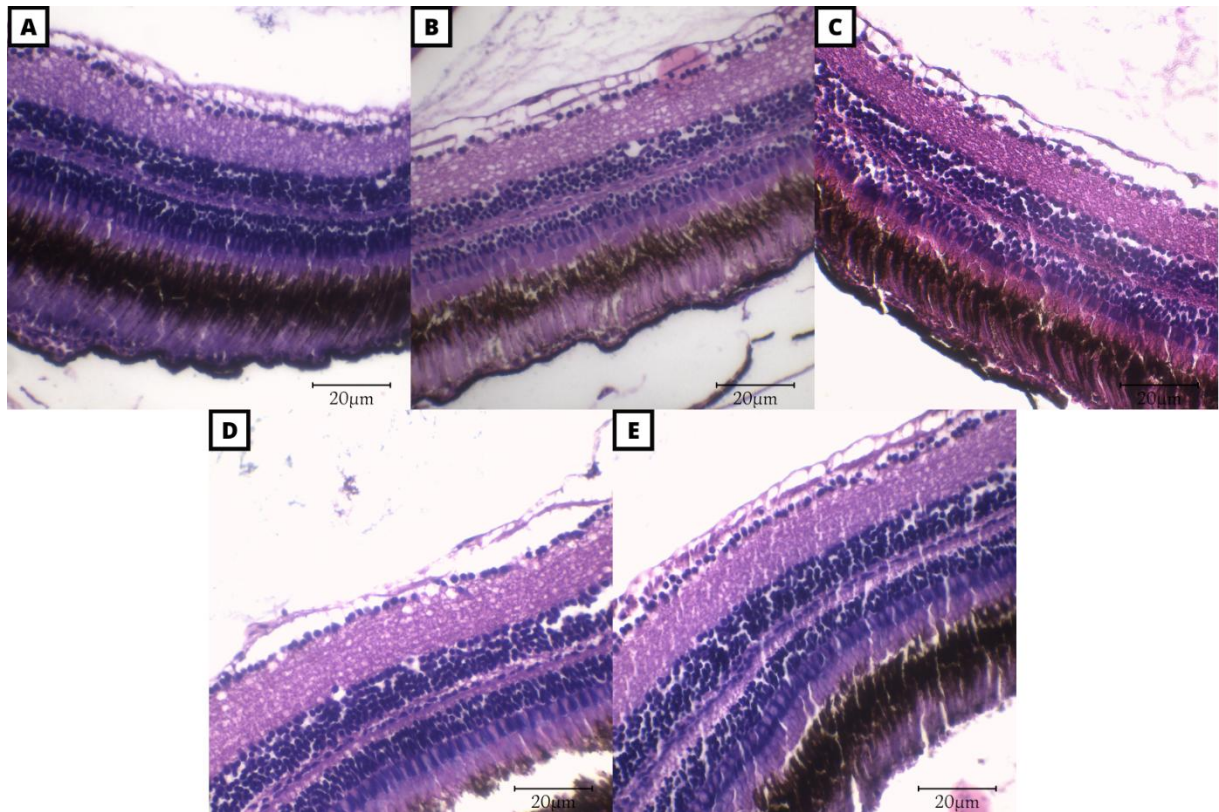
Fonte: Autor (2025).

O ORP, um método indireto que mensura em milivolts (mV) a capacidade total de um ou vários oxidantes em uma solução para oxidar um eletrodo. Baseando nisso, os resultados obtidos por meio dessa mensuração estão de acordo ao descrito por Gonçalves e Gagnon (2011), na qual ocorre um aumento do ORP durante a aplicação do ozônio, e ao término desse processo, o potencial de oxirredução começa a diminuir, característica essa que ocorre devido à degradação da molécula de O_3 . Dessa forma, é possível evidenciar a presença do composto oxidante na água, uma vez que a confirmação da presença do ozônio na água é uma característica fundamental para determinar adequadamente os efeitos biológicos que o composto pode ter proporcionado nos modelos animais.

5.1.2. Análises morfológicas dos olhos

Por meio da avaliação morfológica retiniana a partir das lâminas histológicas, não foi observada nenhuma alteração no tecido ocular, conforme evidenciado na figura 9.

Figura 9 - Imagens histológicas da retina de peixes zebrafish do ensaio 1 sem evidências de alterações teciduais. A. Retina de um peixe do grupo controle. B. Retina de um peixe do grupo ozônio 1. C. Retina de um peixe do grupo ozônio 2. D. Retina de um peixe do grupo ozônio 3. E. Retina de um peixe do grupo ozônio 4.



Fonte: Autor (2025).

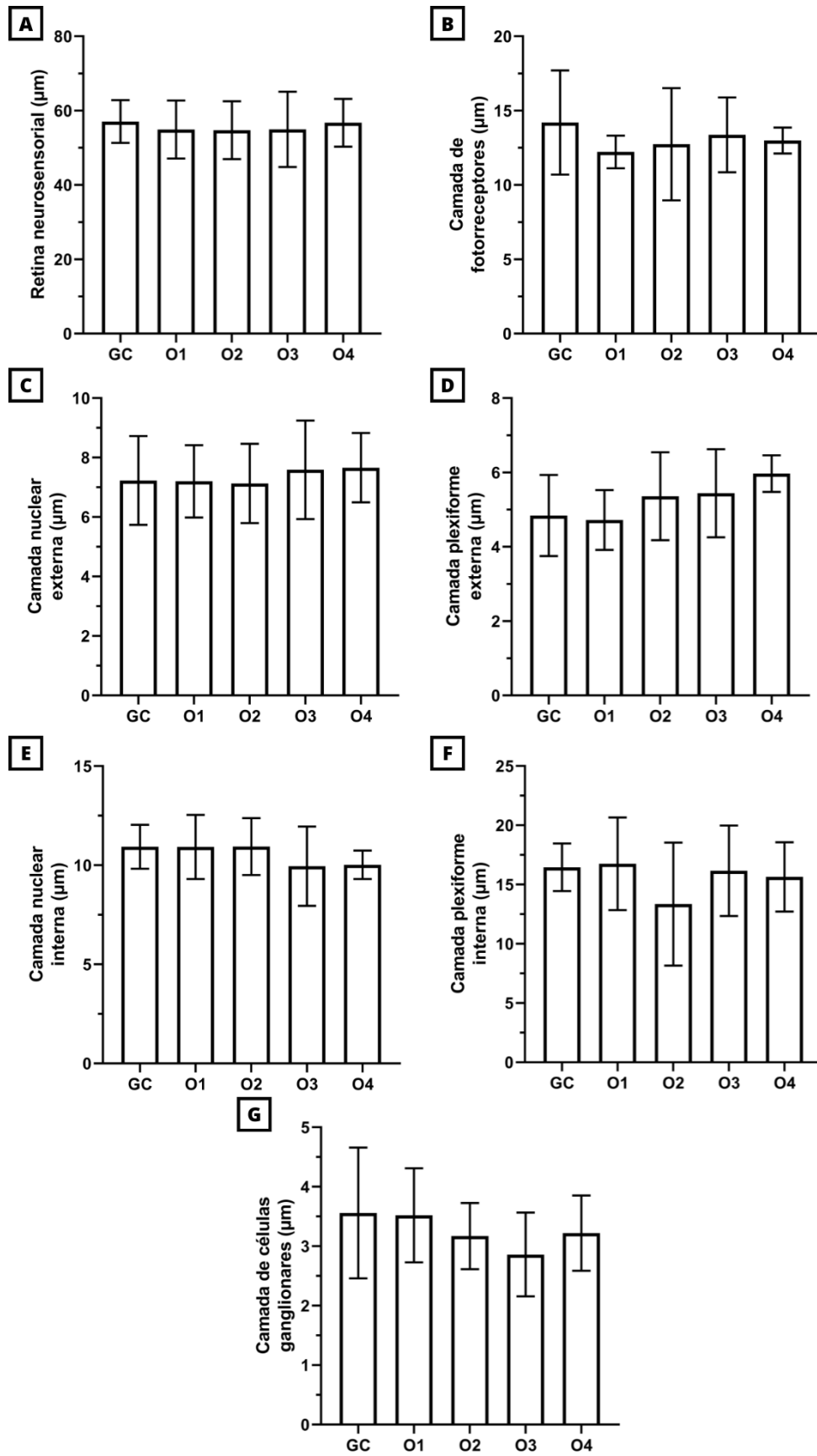
A mensuração aproximada da espessura da retina neurosensorial (RNS) dos grupos experimentais, evidenciou que em média elas apresentavam uma espessura da $57,06 \pm 5,73 \mu\text{m}$ no grupo controle, $54,93 \pm 7,81 \mu\text{m}$ no O1, $54,73 \pm 7,79 \mu\text{m}$ no O2, $54,98 \pm 10,13 \mu\text{m}$ no O3 e $56,74 \pm 6,43 \mu\text{m}$ no O4, conforme demonstrado na figura 10A. Tais valores demonstram que não houve alterações significativas (Tukey, $p > 0,05$) da espessura da retina neurosensorial entre os grupos.

Quanto às camadas externas da retina neurosensorial, observou-se uma espessura média da camada de fotorreceptores (CFT) de $14,20 \pm 3,50 \mu\text{m}$ no grupo controle, $12,22 \pm 1,09 \mu\text{m}$ no O1, $12,74 \pm 3,77 \mu\text{m}$ no O2, $13,37 \pm 2,52 \mu\text{m}$ no O3 e $12,99 \pm 0,87 \mu\text{m}$ no O4, conforme demonstrado na figura 10B. Na camada nuclear externa (CNE) apresentou-se em média uma espessura de $7,23 \pm 1,50 \mu\text{m}$ no grupo controle, $7,20 \pm 1,14 \mu\text{m}$ no O1, $7,13 \pm 1,33 \mu\text{m}$ no O2, $7,59 \pm 1,66 \mu\text{m}$ no O3 e $7,66 \pm 1,17 \mu\text{m}$ no O4, conforme observado na figura 10C. Já a camada

plexiforme externa (CPE) apresentou em média uma espessura de $4,84 \pm 1,09 \mu\text{m}$ no grupo controle, $4,72 \pm 0,80 \mu\text{m}$ no O1, $5,36 \pm 1,18 \mu\text{m}$ no O2, $5,44 \pm 1,19 \mu\text{m}$ no O3 e $5,97 \pm 0,49 \mu\text{m}$ no O4, conforme demonstrado na figura 10D. Não havendo diferenças significativas quanto a espessura das três camadas em comparação entre os grupos (Tukey, $p > 0,05$).

Em relação às camadas internas, observou-se que a camada nuclear interna (CNI) apresentou em média uma espessura de $10,93 \pm 1,11 \mu\text{m}$ no grupo controle, $10,92 \pm 1,62 \mu\text{m}$ no O1, $10,94 \pm 1,44 \mu\text{m}$ no O2, $9,95 \pm 2,00 \mu\text{m}$ no O3 e $10,02 \pm 0,72 \mu\text{m}$ no O4, conforme evidenciado na figura 10E. A camada plexiforme interna (CPI) apresentou em média uma espessura de $16,45 \pm 2,01 \mu\text{m}$ no grupo controle, $16,75 \pm 3,90 \mu\text{m}$ no O1, $13,35 \pm 5,19 \mu\text{m}$ no O2, $16,16 \pm 3,82 \mu\text{m}$ no O3 e $15,65 \pm 2,92 \mu\text{m}$ no O4, conforme evidenciado na figura 10F. E a camada de células ganglionares (CCG) apresentou em média uma espessura de $3,56 \pm 1,10 \mu\text{m}$ no grupo controle, $3,52 \pm 0,79 \mu\text{m}$ no O1, $3,17 \pm 0,56 \mu\text{m}$ no O2, $2,86 \pm 0,70 \mu\text{m}$ no O3 e $3,22 \pm 0,63 \mu\text{m}$ no O4, conforme evidenciado na figura 10G. Não havendo diferenças significativas quanto a espessura das três camadas em comparação entre os grupos (Tukey, $p > 0,05$).

Figura 10 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão da espessura da retina neurosensorial e suas camadas de peixes zebrafish do ensaio 1. A. Espessura da retina neurosensorial (RNS). B. Espessura da camada de fotorreceptores (CFT). C. Espessura da camada nuclear externa (CNE). D. Espessura da camada plexiforme externa (CPE). E. Espessura da camada nuclear interna (CNI). F. Espessura da camada plexiforme interna (CPI). G. Espessura da camada de células ganglionares (CCG).



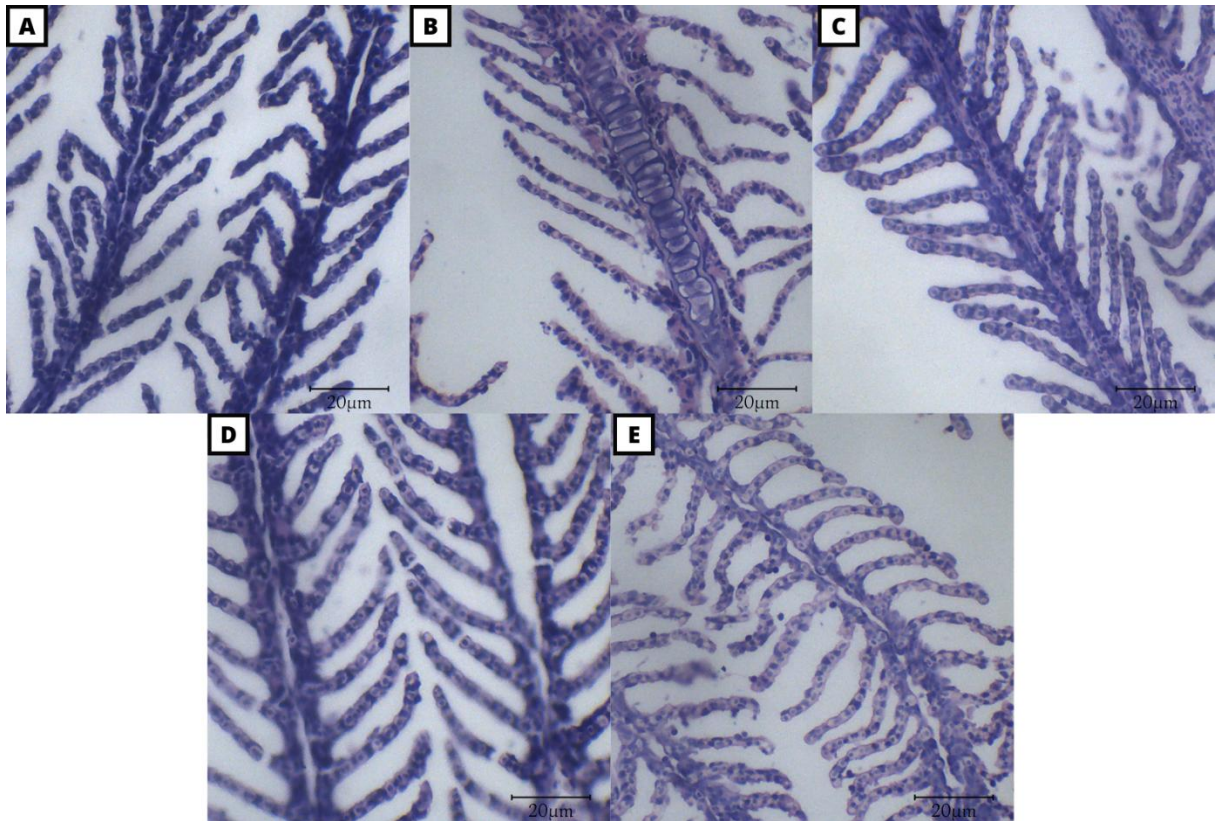
Fonte: Autor (2025).

O zebrafish atualmente é uma espécie modelo para diversas áreas, incluindo-se a de toxicidade ocular, que envolve o estudo da utilização de determinados compostos e como a dosagem, frequência de utilização e tempo de utilização podem influenciar no tecido ocular, incluindo-se na retina (CASSAR et al., 2020; HONG; LUO, 2021). Alguns estudos já vêm utilizando o ozônio para o estudo de diferentes afecções, incluindo as oculares, entretanto, os estudos do efeito do composto sobre o tecido ainda não foram relatados na espécie (DÜZGÜN et al., 2022; KAL et al., 2017; LIU, 2016; XIE et al., 2016). Dessa forma, os resultados obtidos nesse ensaio indicam que o protocolo de aplicação de ozônio utilizado não desencadeou alterações morfológicas e morfométricas no segmento da retina neurossensorial dos peixes, portanto, todas as concentrações e frequências utilizadas no presente trabalho não levaram a toxicidade retiniana, possibilitando em uma primeira avaliação a sua utilização em modelos de afecções retinianas em zebrafish. Ressalta-se que o presente trabalho apenas evidenciou a segurança quanto a morfologia e morfometria retiniana, outras abordagens como avaliação da acuidade visual por meio de testes comportamentais, eletrofisiologia retiniana e efeitos moleculares podem futuramente trazer mais informações complementares acerca do efeito do composto nesse tecido.

5.1.3. Análises morfológicas das brânquias

Por meio da avaliação morfológica branquial a partir das lâminas histológicas, não foi observada nenhuma alteração no tecido branquial, conforme evidenciado na figura 11.

Figura 11 - Imagens histológicas branquiais de peixes zebrafish do ensaio 1 sem evidências de alterações teciduais. A. Brânquia de um peixe do grupo controle. B. Brânquia de um peixe do grupo ozônio 1. C. Brânquia de um peixe do grupo ozônio 2. D. Brânquia de um peixe do grupo ozônio 3. E. Brânquia de um peixe do grupo ozônio 4.



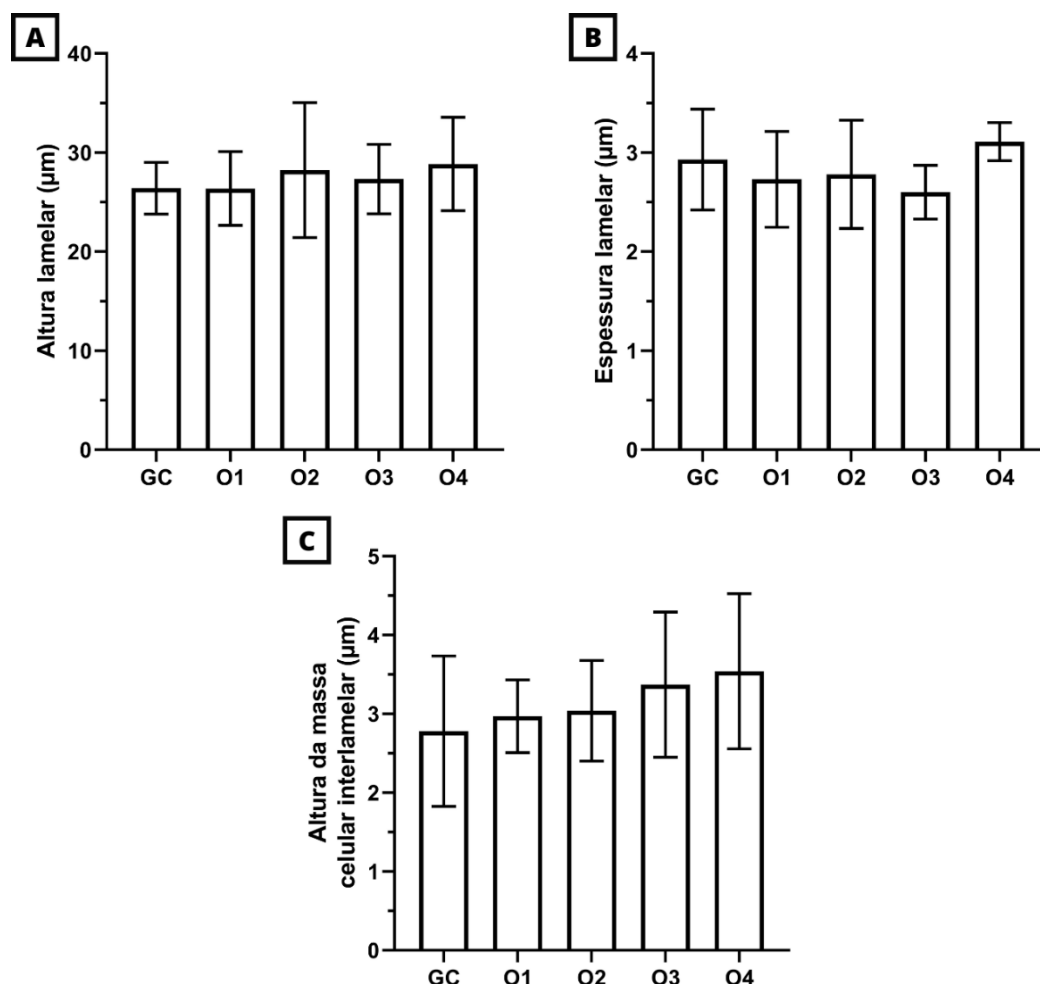
Fonte: Autor (2025).

Por meio da mensuração dos parâmetros morfométricos branquiais, foi possível observar que a altura lamelar apresentou em média $26,40 \pm 2,61 \mu\text{m}$ no grupo controle, $26,37 \pm 3,72 \mu\text{m}$ no O1, $28,23 \pm 6,81 \mu\text{m}$ no O2, $27,33 \pm 3,50 \mu\text{m}$ no O3 e $28,84 \pm 4,72 \mu\text{m}$ no O4, conforme demonstrado na figura 12A. Evidenciando que não houve diferença significativa (Tukey, $p > 0,05$) em relação à altura das lamelas branquiais entre os grupos experimentais.

Quanto a espessura lamelar, foi possível observar $2,93 \pm 0,51 \mu\text{m}$ no grupo controle, $2,73 \pm 0,48 \mu\text{m}$ no O1, $2,78 \pm 0,55 \mu\text{m}$ no O2, $2,60 \pm 0,27 \mu\text{m}$ no O3 e $3,11 \pm 0,19 \mu\text{m}$ no O4, conforme demonstrado na figura 12B. Evidenciando que não houve diferença significativa (Tukey, $p > 0,05$) em relação à espessura das lamelas brânquias entre os grupos experimentais.

A altura da massa celular interlamelar apresentou médias de $2,78 \pm 0,95 \mu\text{m}$ no grupo controle, $2,97 \pm 0,46 \mu\text{m}$ no O1, $3,04 \pm 0,64 \mu\text{m}$ no O2, $3,37 \pm 0,92 \mu\text{m}$ no O3 e $3,54 \pm 0,99 \mu\text{m}$ no O4, conforme demonstrado na figura 12C. Evidenciando que não houve diferença significativa (Tukey, $p > 0,05$) em relação à altura da massa celular interlamelar entre os grupos experimentais.

Figura 12 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão dos parâmetros branquiais de peixes zebrafish do ensaio 1. A. Mensuração da altura lamelar. B. Mensuração da espessura lamelar. C. Mensuração da altura da massa celular interlamelar.



Fonte: Autor (2025).

No desenvolvimento de aplicabilidade de compostos via água, a saúde branquial representa uma característica de destaque a ser averiguada, uma vez que tais compostos tem contato direto com esse tecido e podem desencadear efeitos negativos à saúde branquial e consequentemente a saúde dos animais. Alguns trabalhos já relataram informação acerca do efeito do ozônio sobre o tecido branquial, como o de Stiller et al. (2020), que evidenciou alterações histológicas branquiais adversas em *Salmo salar* (Salmão do atlântico) em condições que a ozonização da água elevou o ORP em valores iguais ou superiores a 350 mV, notando-se sinais de baqueteamento, hiperplasia, hipertrofia e lifting, por exemplo. Já o trabalho de Monteiro (2022), na qual as dosagens de ozônio dos ensaios desse presente trabalho foram baseadas, evidenciou que a aplicação de ozônio desencadeou alterações histológicas como a

hipertrofia, fusão lamelar, aumento de secreção mucosa, proliferação de eritrócitos, sinequias lamelares, vacúolos e curvaturas lamelares, além disso, o trabalho também analisou características morfométricas como a altura lamelar, espaço interlamelar e massa lamelar, parâmetros esses que não sofreram alterações significativas.

O presente trabalho, não observou alterações quando a morfometria branquial, semelhante ao trabalho de Monteiro (2022), dessa forma, evidencia-se que a utilização do composto não interferiu na atividade e saúde branquial, uma vez que quando o tecido se apresenta acometido, o mesmo começa a sofrer alterações morfométricas em resposta. Quando a diferença entre os achados morfológicos descritos por Monteiro (2022) e o presente estudo, supõe-se que tal diferença possa estar envolvida ao tempo de exposição ao composto, uma vez que as mesmas dosagens foram utilizadas, sendo que Monteiro (2022) aplicou o composto ao longo de dez (10) dias seguidos, e o presente trabalho aplicou o composto a cada 48 horas ao longo de quinze (15) dias.

5.1.4. Avaliação do efeito oxidativo nos olhos

Por meio da espectrofotometria, observaram-se níveis médios de absorbância das EROs de $33,99 \pm 5,61 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no grupo controle, $111,02 \pm 16,35 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no O1, $102,35 \pm 33,32 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no O2, $96,49 \pm 20,60 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no O3 e $110,32 \pm 26,63 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no O4, conforme demonstrado na figura 13A. Evidenciando que houve um aumento significativo entre os grupos submetidos a aplicação do ozônio em relação ao grupo controle (Tukey, $p < 0,05$).

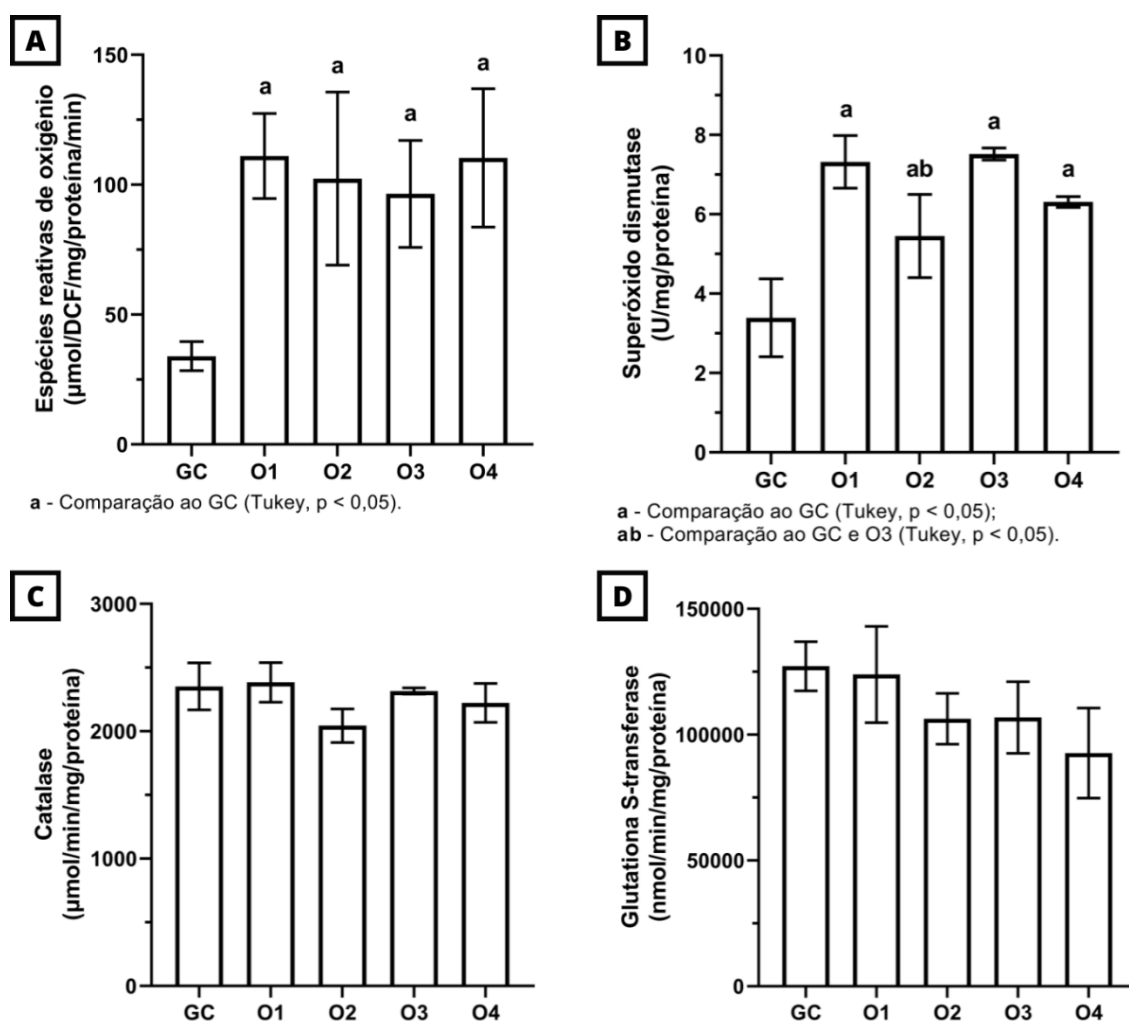
A atividade da enzima SOD, foi demonstrado por meio dos níveis médios da sua absorbância, sendo de $3,39 \pm 0,98 \text{ U/mg/proteína}$ no grupo controle, $7,32 \pm 0,66 \text{ U/mg/proteína}$ no O1, $5,45 \pm 1,05 \text{ U/mg/proteína}$ no O2, $7,52 \pm 1,15 \text{ U/mg/proteína}$ no O3 e $6,31 \pm 0,14 \text{ U/mg/proteína}$ no O4, conforme demonstrado na figura 13B. Evidenciando um aumento significativo (Tukey, $p < 0,05$) da atividade antioxidante da superóxido dismutase dos grupos testados em relação ao controle. Além disso, também há uma diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) entre os grupos O3 e O2.

Quanto a enzima CAT, por meio da espectrofotometria observaram-se níveis médios de $2352,41 \pm 185,09 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no grupo controle, $2383,95 \pm 155,82 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no O1, $2043,98 \pm 132,16 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no O2, $2315,93 \pm 24,13$

$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ no O3 e $2223,08 \pm 152,48 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ no O4, conforme demonstrado na figura 13C. Não havendo diferenças significativas quanto a atividade da catalase em comparação entre os grupos (Tukey, $p > 0,05$).

Em relação a GST, foram observados níveis médios de $127189,51 \pm 9773,48 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ no grupo controle, $123934,59 \pm 19153,63 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ no O1, $106360,73 \pm 10089,54 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ no O2, $106825,37 \pm 14250,07 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ no O3 e $92687,31 \pm 179000,55 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ no O4, conforme demonstrado na figura 13D. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (Tukey, $p > 0,05$) em relação a comparação da atividade da GST entre os grupos.

Figura 13 - Mensuração dos níveis médios e desvio padrão do efeito oxidativo nos olhos de peixes zebrafish do ensaio 1. A. Mensuração das espécies reativas de oxigênio (EROs). B. Mensuração da enzima superóxido dismutase (SOD). C. Mensuração da enzima catalase (CAT). D. Mensuração da enzima glutathione S-transferase (GST).



Fonte: Autor (2025).

Em relação a dimensão do efeito nos parâmetros que evidenciaram diferenças estatísticas acerca da utilização do composto nos grupos ozônio, observou-se em relação as EROs e a SOD impacto enorme nos grupos em todos os grupos (d de Cohen $> 2,00$), conforme evidenciado na tabela 4.

Tabela 4 - Dimensão de efeito dos grupos ozônio em comparação ao controle quando aos parâmetros da resposta oxidativa que apresentaram diferenças estatísticas evidenciadas.

Parâmetro	Comparação		D de Cohen	Intervalo de confiança a 95%		Dimensão de efeito
	Grupo	Grupo		Lim. inferior	Lim. superior	
Espécies reativas de oxigênio	Controle	Ozônio 1	-3,42	-5,91	-0,93	Enorme
		Ozônio 2	-3,03	-5,40	-0,67	Enorme
		Ozônio 3	-2,77	-5,06	-0,49	Enorme
		Ozônio 4	-3,39	-5,87	-0,90	Enorme
Superoxido dismutase	Controle	Ozônio 1	-5,51	-8,80	-2,22	Enorme
		Ozônio 2	-2,88	-5,20	-0,57	Enorme
		Ozônio 3	-5,78	-9,19	-2,37	Enorme
		Ozônio 4	-4,08	-4,08	-1,35	Enorme

Fonte: Autor (2025).

Baseando-se nesses achados, observa-se que a aplicação do ozônio via água desencadeou um estresse oxidativo intraocular, detectado por meio da elevação das EROs associada a SOD, provavelmente para manutenção do equilíbrio redox. Essa elevação, associada a ausência de alterações morfológicas e morfométricas retinianas, caracteriza como descrito por Bocci (2007), um estresse oxidativo agudo controlado, capaz de ativar processos biológicos que desencadeiam em efeitos benéficos ao organismo. O estresse oxidativo pode ser entendido como um processo bioquímico que pode afetar as células orgânicas de diversas formas fisiológicas e patológicas, dependendo do grau desse estado (INAL et al., 2011). Em situações fisiológicas, esse processo aumenta a atuação da via Nrf2, elevando mecanismos antioxidantes que podem restabelecer o equilíbrio redox em casos de doenças preexistentes com mecanismo oxidativo (SMITH et al., 2017). Além disso, destaca-se que todas as concentração

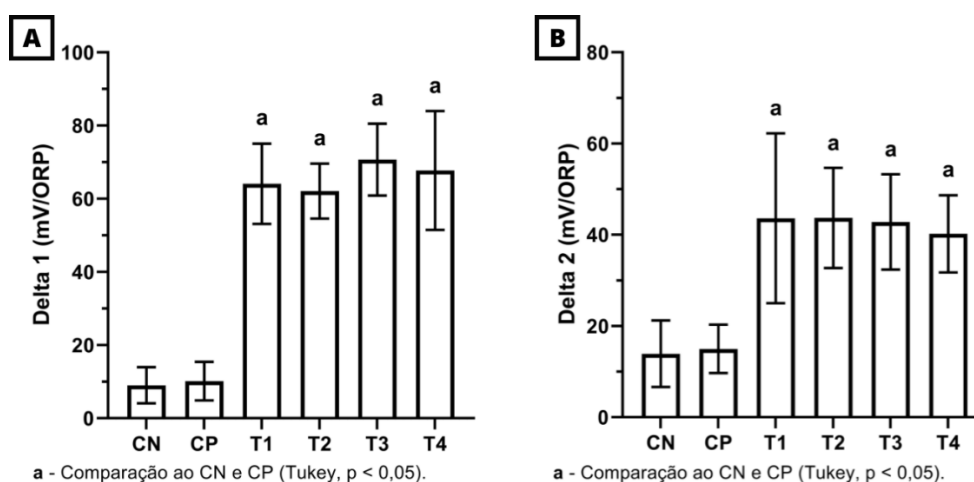
tiveram a mesma dimensão de efeito sobre a resposta oxidativa, portanto, nenhuma foi mais ou menos eficiente nesse quesito.

5.2. Ensaio 2: Uso do ozônio durante o desenvolvimento da retinopatia diabética no modelo Zebrafish

5.2.1. Mensuração do potencial de oxirredução

O ORP apresentou níveis médios no delta 1 de $9,02 \pm 4,92$ mV no CN, $10,17 \pm 5,28$ mV no CP, $64,10 \pm 10,99$ mV no T1, $62,08 \pm 7,50$ mV no T2, $70,69 \pm 9,81$ mV no T3 e $67,72 \pm 16,26$ mV no O4, conforme observado na figura 14A. Já no delta 2, foram observados de $13,91 \pm 7,29$ mV no CN, $14,97 \pm 5,31$ mV no CP, $43,61 \pm 18,62$ mV no T1, $43,70 \pm 10,99$ mV no T2, $42,81 \pm 10,46$ mV no T3 e $40,21 \pm 8,46$ mV no T4, conforme demonstrado na figura 14B. Dessa forma, evidenciou-se um aumento significativo (Tukey, $p < 0,05$) do ORP de todos os grupos tratados com ozônio em relação aos controles no delta 1 e 2. Além disso, não foram encontrados resultados significativos (Tukey, $p > 0,05$) em comparação entre os grupos submetidos a aplicação do ozônio via água.

Figura 14 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão dos níveis de ORP calculados nos deltas do ensaio 2. A. Delta 1. B. Delta 2.



Fonte: Autor (2025).

Semelhante ao descrito na mensuração do potencial de oxirredução do ensaio 1 desse trabalho, os resultados do ensaio 2 também correspondem às alterações do ORP desencadeadas pela aplicação do ozônio, conforme evidenciado por Gonçalves e Gagnon (2011). Dessa forma, também foi possível evidenciar a presença do composto na água e inferir a responsabilidade do mesmo pelos efeitos biológicos desencadeados no modelo animal.

Glicemia	C. negativo	C. positivo	-1,52	-2,11	-0,94	Muito grande
		G. Teste 1	-1,37	-1,95	-0,79	Muito grande
		G. Teste 2	-1,26	-1,84	-0,68	Muito grande
		G. Teste 3	-1,07	-1,67	-0,52	Grande
		G. Teste 4	-1,70	-2,29	-1,10	Muito grande

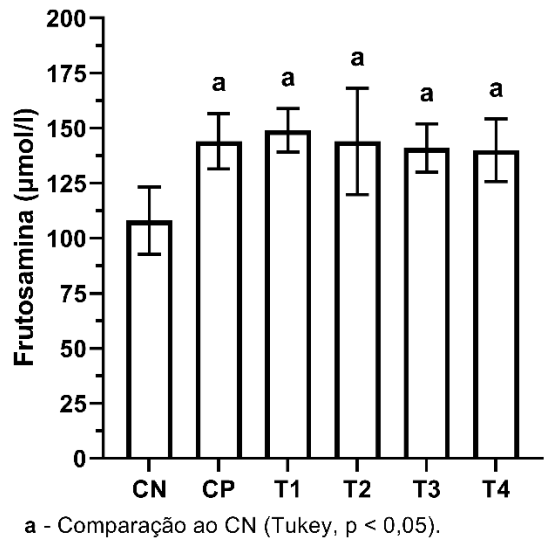
Fonte: Autor (2025).

Esses resultados são consistentes com trabalhos anteriores, na qual a exposição alternada a solução de glicose 2% proporcionou a elevação da glicose na corrente sanguínea, dessa forma, proporcionando um estado hiperglicêmico nos zebrafish que proporciona a RD (CONNAUGHTON et al., 2016; TANVIR et al., 2018). Entretanto, ressalta-se que a glicemia sanguínea é uma mensuração momentânea do estado hiperglicêmico, e não indica necessariamente os quadros hiperglicêmicos persistentes envolvidos na patogenia da doença, além disso, o parâmetro também pode ser influenciado por fatores externos como o estresse (CAPIOTTI et al., 2014). Devido a isso, esse parâmetro foi associado a mensuração das proteínas glicadas para maior confiabilidade nos resultados.

5.2.3. Análise das proteínas glicadas dos olhos

Por meio do ensaio de quantificação da frutossamina, observaram-se níveis médios de $108 \pm 15,39 \mu\text{mol/l}$ no CN, $144 \pm 12,55 \mu\text{mol/l}$ no CP, $149 \pm 9,90 \mu\text{mol/l}$ no T1, $144 \pm 24,13 \mu\text{mol/l}$ no T2, $141 \pm 10,98 \mu\text{mol/l}$ no T3 e $140 \pm 14,26 \mu\text{mol/l}$ no T4, conforme demonstrado no gráfico 4. Evidenciando que um aumento significativo (Tukey, $p < 0,05$) da concentração de frutossamina nos olhos dos animais dos grupos expostos à solução de glicose 2% (CP, T1, T2, T3 e T4) em comparação aos níveis médios do CN. Além disso, evidenciou-se que a exposição a glicose 2% teve dimensão de efeito enorme (d de Cohen $> 2,00$) em todos os grupos expostos, conforme observado na tabela 6.

Gráfico 2 - Mensuração dos níveis médios e desvio padrão das proteínas glicadas dos olhos de peixes zebrafish do ensaio 2.



Fonte: Autor (2025).

Tabela 6 - Dimensão de efeito sobre a frutossamina dos grupos expostos a glicose testes em comparação ao controle negativo.

Parâmetro	Comparação		D de Cohen	Intervalo de confiança a 95%		Dimensão de efeito
	Grupo	Grupo		Lim. inferior	Lim. superior	
Frutosamina	C. negativo	C. positivo	-2,29	-3,78	-0,81	Enorme
		G. Teste 1	-2,67	-4,21	-1,13	Enorme
		G. Teste 2	-2,35	-3,84	-0,86	Enorme
		G. Teste 3	-2,11	-3,64	-0,58	Enorme
		G. Teste 4	-2,06	-3,52	-0,61	Enorme

Fonte: Autor (2025).

A frutossamina, trata-se de uma molécula formada a partir da conjugação da glicose com proteínas livres de maneira não enzimática, decorrente de quadros hiperglicêmicos crônicos ao longo de semanas, e associada a hemoglobina glicosilada é um parâmetro utilizado para avaliação do controle glicêmico em indivíduos com DM. Baseando-se nisso, os resultados dessa mensuração evidenciam que os animais induzidos desenvolveram um quadro de hiperglicemia persistente ao longo desses 30 dias de experimento, achados esses em concordância ao descrito por Capiotti et al. (2014). Dessa forma, em associação aos resultados de glicemia sanguínea,

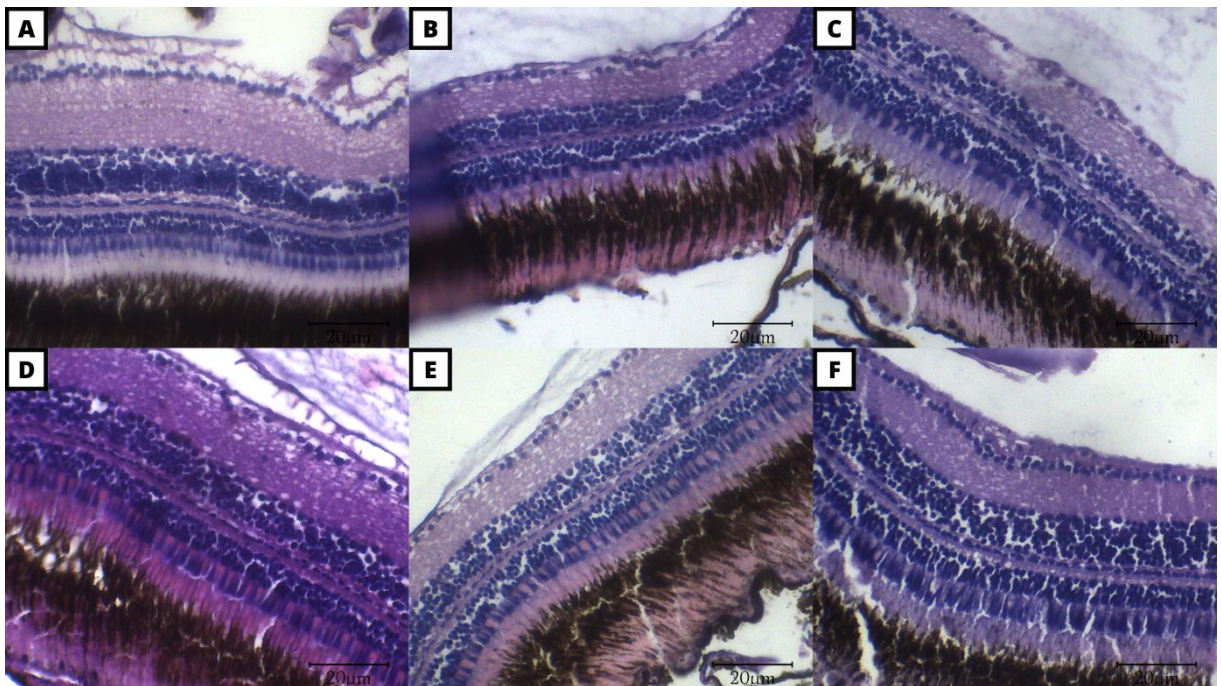
evidencia-se que o método de indução hiperglicêmico de Gleeson, Connaughton e Arneson (2007), desencadeou os processos hiperglicêmicos desejados para o desenvolvimento do quadro de retinopatia diabética, uma vez que foi evidenciado a partir das análises morfométricas retinianas alterações quanto a espessura do tecido.

5.2.4. Análises morfológicas dos olhos

Por meio da avaliação morfológica retiniana a partir das lâminas histológicas, não foi observada nenhuma alteração no tecido ocular, conforme evidenciado na figura 20.

Figura 15 - Imagens histológicas da retina de peixes zebrafish sem evidências de alterações teciduais.

A. Retina de um peixe do grupo controle negativo. B. Retina de um peixe do grupo controle positivo. C. Retina de um peixe do grupo teste 1. D. Retina de um peixe do grupo teste 2. E. Retina de um peixe do grupo teste 3. F. Retina de um peixe do grupo teste 4.



Fonte: Autor (2025).

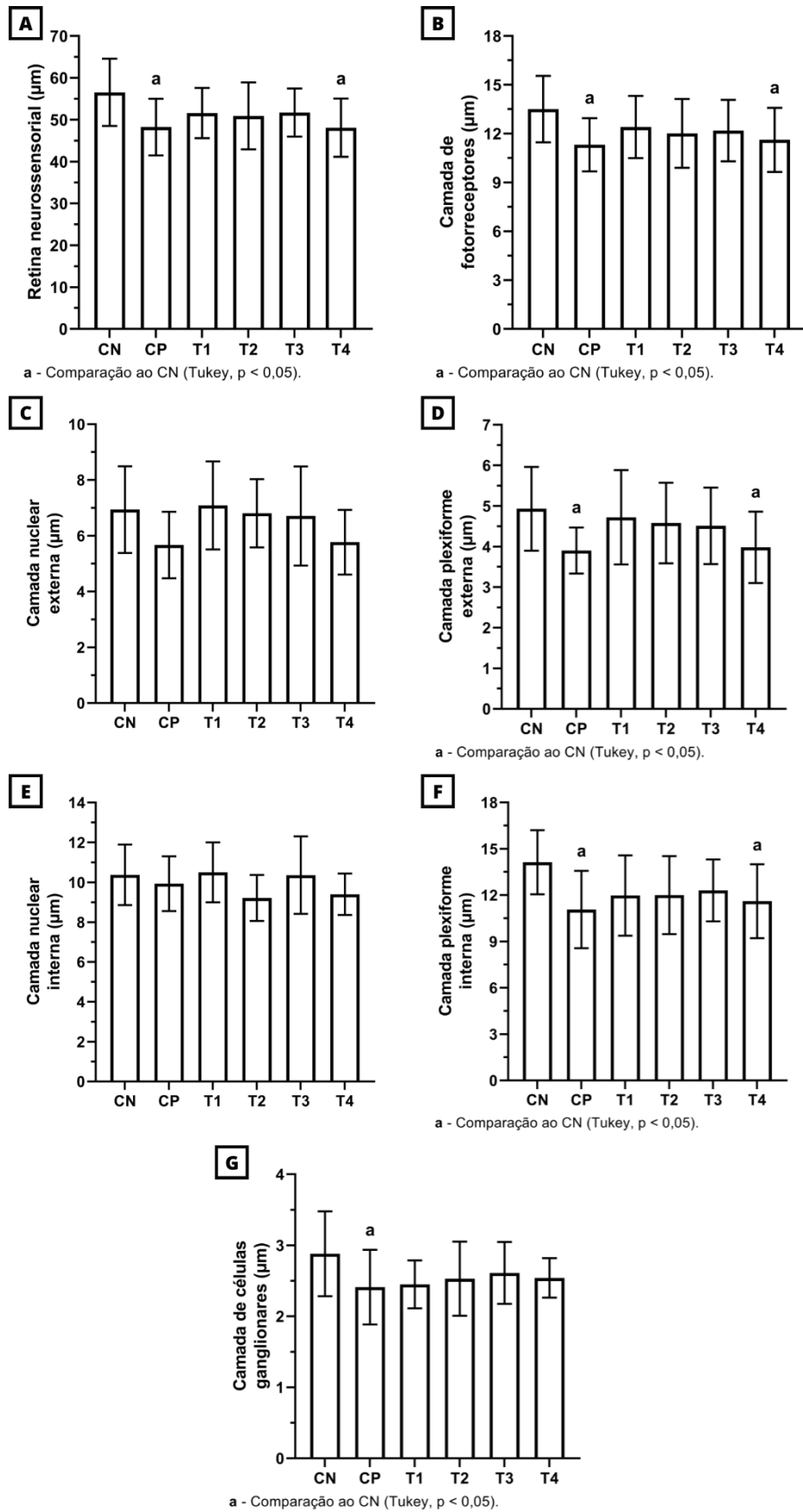
A mensuração da espessura da retina neurosensorial (RNS) dos grupos experimentais, evidenciou que em média as mesmas apresentavam uma espessura da $56,55 \pm 8,05 \mu\text{m}$ no CN, $48,24 \pm 6,77 \mu\text{m}$ no CP, $51,58 \pm 6,01 \mu\text{m}$ no T1, $50,89 \pm 8,00 \mu\text{m}$ no 2, $51,70 \pm 5,75 \mu\text{m}$ no T3 e $48,09 \pm 6,96 \mu\text{m}$ no T4, conforme evidenciado na figura 16A. Tais valores demonstram que houve uma diminuição significativa (Tukey, $p < 0,05$) da espessura da retina neurosensorial

CP e T4 em comparação ao CN, além disso, não foram observados resultados significativos em relação a comparação dos demais grupos.

Quanto às camadas externas da retina neurosensorial, observou-se uma espessura média da camada de fotorreceptores (CFT) de $13,51 \pm 2,04 \mu\text{m}$ no CN, $11,32 \pm 1,64 \mu\text{m}$ no CP, $12,41 \pm 1,91 \mu\text{m}$ no T1, $12,02 \pm 2,12 \mu\text{m}$ no T2, $12,19 \pm 1,89 \mu\text{m}$ no T3 e $11,62 \pm 1,97 \mu\text{m}$ no T4, conforme evidenciado na figura 16B. Na camada nuclear externa (CNE) observou-se em média uma espessura de $6,94 \pm 1,55 \mu\text{m}$ no CN, $5,67 \pm 1,19 \mu\text{m}$ no CP, $7,09 \pm 1,58 \mu\text{m}$ no T1, $6,81 \pm 1,22 \mu\text{m}$ no T2, $6,71 \pm 1,78 \mu\text{m}$ no T3 e $5,77 \pm 1,16 \mu\text{m}$ no T4, conforme evidenciado na figura 16C. Já a camada plexiforme externa (CPE) apresentou em média uma espessura de $4,93 \pm 1,03 \mu\text{m}$ no CN, $3,90 \pm 0,57 \mu\text{m}$ no CP, $4,72 \pm 1,16 \mu\text{m}$ no T1, $4,58 \pm 0,99 \mu\text{m}$ no T2, $4,51 \pm 0,94 \mu\text{m}$ no T3 e $3,98 \pm 0,88 \mu\text{m}$ no T4, conforme evidenciado na figura 16D. Evidenciando uma diminuição significativa da CFT e da CPE (Tukey, $p < 0,05$) entre os grupos CP e T4 em comparação ao CN. Além disso, não houve diferenças significativas quanto a espessura da CNE em comparação entre os grupos (Games-Howell, $p > 0,05$).

Em relação às camadas internas, observou-se que a camada nuclear interna (CNI) apresentou em média uma espessura de $10,37 \pm 1,52 \mu\text{m}$ no CN, $9,93 \pm 1,37 \mu\text{m}$ no CP, $10,50 \pm 1,50 \mu\text{m}$ no T1, $9,21 \pm 1,15 \mu\text{m}$ no T2, $10,36 \pm 1,95 \mu\text{m}$ no T3 e $9,40 \pm 1,04 \mu\text{m}$ no T4, conforme evidenciado na figura 16E. Não havendo diferenças significativas entre os grupos (Tukey, $p > 0,05$). A camada plexiforme interna (CPI) apresentou em média uma espessura de $14,13 \pm 2,07 \mu\text{m}$ no CN, $11,07 \pm 2,50 \mu\text{m}$ no CP, $11,98 \pm 2,60 \mu\text{m}$ no T1, $12,00 \pm 2,52 \mu\text{m}$ no T2, $12,31 \pm 2,01 \mu\text{m}$ no T3 e $11,61 \pm 2,40 \mu\text{m}$ no T4, conforme evidenciado na figura 16F. Evidenciando uma diminuição significativa (Tukey, $p < 0,05$) da espessura nos grupos CP e T4 em relação ao CN. E a camada de células ganglionares (CCG) apresentou em média uma espessura de $2,88 \pm 0,60 \mu\text{m}$ no CN, $2,41 \pm 0,53 \mu\text{m}$ no CP, $2,45 \pm 0,33 \mu\text{m}$ no T1, $2,53 \pm 0,52 \mu\text{m}$ no T2, $2,61 \pm 0,44 \mu\text{m}$ no T3 e $2,54 \pm 0,28 \mu\text{m}$ no T4, conforme evidenciado na figura 16G. Destacando uma diminuição significativa (Tukey, $p < 0,05$) do CP em relação ao CN.

Figura 16 - Representação gráfica dos níveis médio e desvio padrão da espessura da retina neurosensorial e suas camadas de peixes zebrafish do ensaio 2. A. Espessura da retina neurosensorial (RNS). B. Espessura da camada de fotorreceptores (CFT). C. Espessura da camada nuclear externa (CNE). D. Espessura da camada plexiforme externa (CPE). E. Espessura da camada nuclear interna (CNI). F. Espessura da camada plexiforme interna (CPI). G. Espessura da camada de células ganglionares (CCG).



Fonte: Autor (2025).

Em relação a dimensão do efeito nos parâmetros que evidenciaram diferenças estatísticas acerca da utilização do composto nos grupos testes, observou-se impacto pequeno do tratamento na RNS nos grupos T1 a T3 (d de Cohen $> 0,20$ e $< 0,50$) e muito pequeno no T4 (d de Cohen = 0,02). Já na CFT, observou-se impacto médio no T1 (d de Cohen = -0,56), pequeno (d de Cohen $> 0,20$ e $< 0,50$) no T2 e T3, e muito pequeno no T4 (d de Cohen = -0,15). Na CPE, evidenciou-se impacto grande no T1 (d de Cohen = -0,86), médio no T2 e T3 (d de Cohen $> 0,50$ e $< 0,80$), e muito pequeno no T4 (d de Cohen = -0,09). Quanto a CPI, observou-se impacto pequeno no T1, T2 e T4 (d de Cohen $> 0,20$ e $< 0,50$), e médio no T3 (d de Cohen = -0,53). Resultados esses evidenciados na tabela 7.

Tabela 7 - Dimensão de efeito dos grupos testes em comparação ao controle positivo nos parâmetros morfométricos retinianos que houve diferenças estatísticas evidenciadas.

Parâmetro	Comparação		D de Cohen	Intervalo de confiança a 95%		Dimensão de efeito
	Grupo	Grupo		Lim. inferior	Lim. superior	
Retina neurossensorial	C. positivo	G. Teste 1	-0,48	-1,19	0,24	Pequeno
		G. Teste 2	-0,38	-1,06	0,31	Pequeno
		G. Teste 3	-0,49	-1,17	0,18	Pequeno
		G. Teste 4	0,02	-0,66	0,70	Muito pequeno
Camada de fotorreceptores	C. positivo	G. Teste 1	-0,56	-1,28	0,16	Médio
		G. Teste 2	-0,36	-1,05	0,32	Pequeno
		G. Teste 3	-0,45	-1,13	0,23	Pequeno
		G. Teste 4	-0,15	-0,84	0,53	Muito pequeno
Camada plexiforme externa	C. positivo	G. Teste 1	-0,86	-1,61	-0,11	Grande
		G. Teste 2	-0,71	-1,43	1,62	Médio
		G. Teste 3	-0,65	-1,35	0,06	Médio
		G. Teste 4	-0,09	-0,80	0,62	Muito pequeno
Camada plexiforme interna	C. positivo	G. Teste 1	-0,39	-1,12	0,34	Pequeno
		G. Teste 2	-0,39	-1,09	0,30	Pequeno
		G. Teste 3	-0,53	-1,21	0,15	Médio
		G. Teste 4	-0,23	-0,91	0,46	Pequeno

Fonte: Autor (2025).

Dessa forma, esses resultados indicam que houve um processo de neurodegeneração, característico da retinopatia diabética, desencadeado pelo protocolo de indução hiperglicêmica utilizado e observado pela redução da espessura média dos grupos induzidos. Destaca-se que esse processo foi mais observado nos grupos CP e T4, que apresentaram redução estatisticamente significativa da espessura da RNS, CFT, CPE e CPI, além disso, o grupo CP também apresentou diminuição da CCG.

Em relação aos grupos testes, os resultados indicam que a utilização do composto proporcionou um controle do processo degenerativo nos grupos T1 a T3, e consequentemente, evitando-se uma diminuição evidente da espessura total da retina neurossensorial e de suas camadas, com destaque ao T1 que teve impacto mais expressivo CFT e CPE. Esses dados possibilitam gerar hipóteses baseadas nos mecanismos patológicos da doença, principalmente os oxidativos, uma vez que eles estão intimamente relacionados aos processos de neurodegeneração, diretamente por meio de estímulos de autofagia a apoptose celular, e indiretamente por estímulos de citocinas inflamatórias que desencadeiam quadros inflamatórios que podem proporcionar a neurodegeneração por piroptose (OLVERA-MONTAÑO et al., 2019). Dentre esses tipos de morte celular, ressalta-se que já foi evidenciado por Liu (2016) que o ozônio promove redução da apoptose celular no tecido retiniano de roedores, dessa forma, reforça-se a possibilidade de que o mesmo ocorre no modelo zebrafish. Além disso, também já foi demonstrado por Xie et al., (2016) que o ozônio proporciona redução de citocinas inflamatórias e de VEGF, o que também se relaciona com o desenvolvimento de piroptose e necrose na RD. Dessa forma, indica-se que novos estudos e análises acerca desses mecanismos sejam realizados para a maior compreensão no modelo de retinopatia diabética hiperglicêmica em zebrafish.

Quanto aos resultados observados no grupo T4, evidenciou-se que o mesmo não proporcionou o controle do processo degenerativo observado nos demais grupos, destacando-se o impacto menos expressivo nos parâmetros analisados. Uma hipótese que pode ser gerada envolve a dose e a frequência de aplicação do composto, uma vez que já foi postulado na literatura que concentrações baixas do ozônio podem não desencadear efeitos biológicos e concentrações elevadas podem desencadear efeitos tóxicos a partir do excesso de formação de EROs e LOPs (BOCCI, 2004; LIU et al., 2023).

Ressalta-se que o grupo CP exposto apenas a alteração entre glicose 2% em água e apenas água, apresentou resultados consistentes com os trabalhos de Gleeson, Connaughton e

Arneson (2007) e Tanvir et al. (2018), apresentando uma diminuição da espessura da CPI e CPE, respectivamente. Entretanto, difere do que foi evidenciado por Gleeson, Connaughton e Arneson (2007) e Tanvir et al. (2018), em relação a diminuição CFT e CCG, que não foram relatadas anteriormente no modelo zebrafish.

5.2.5. Avaliação do efeito oxidativo nos olhos

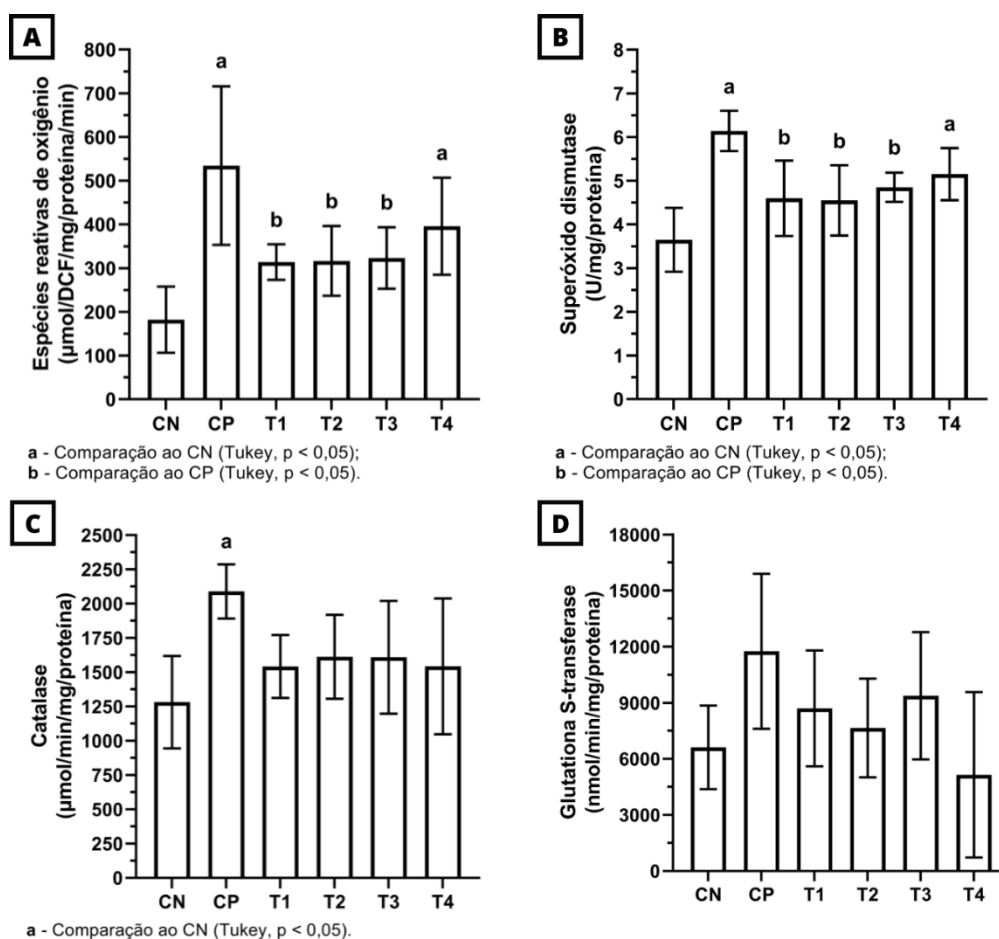
Por meio da espectrofotometria, observaram-se níveis médios de absorbância das EROs de $182,09 \pm 75,45 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no CN, $534,60 \pm 181,46 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no CP, $313,88 \pm 40,70 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no T1, $316,56 \pm 79,59 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no T2, $323,22 \pm 70,18 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no T3 e $395,72 \pm 111,08 \mu\text{mol/DCF/mg/proteína/min}$ no T4, conforme demonstrado na figura 17A. Tais dados não apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p < 0,05$), dessa forma, foram normalizados via transformação em raiz, posteriormente foi possível evidenciar um aumento significativo (Tukey, $p < 0,05$) da quantidade de EROs dos grupos CP e T4 em relação ao grupo CN. Além disso, também se observou que os valores encontrados nos grupos T1, T2 e T3 foram significativamente menores (Tukey, $p < 0,05$) do que o CP.

A atividade da enzima SOD, foi demonstrado por meio dos níveis médios da sua absorbância, sendo de $3,65 \pm 0,73 \text{ U/mg/proteína}$ no CN, $6,14 \pm 0,46 \text{ U/mg/proteína}$ no CP, $4,60 \pm 0,86 \text{ U/mg/proteína}$ no T1, $4,55 \pm 0,80 \text{ U/mg/proteína}$ no T2, $4,85 \pm 0,33 \text{ U/mg/proteína}$ no T3 e $5,15 \pm 0,60 \text{ U/mg/proteína}$ no T4, conforme demonstrado na figura 17B. Evidenciando um aumento significativo (Tukey, $p < 0,05$) da atividade antioxidante da superóxido dismutase dos grupos CP e T4 em relação ao grupo CN. Além disso, também se observou que os valores encontrados nos grupos T1, T2 e T3 foram significativamente menores (Tukey, $p < 0,05$) do que o CP.

Quanto a enzima CAT, por meio da espectrofotometria observaram-se níveis médios de $1282,19 \pm 337,19 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no CN, $2089,89 \pm 197,78 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no CP, $1542,20 \pm 229,53 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no T1, $1612,75 \pm 305,52 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no T2, $1609,56 \pm 411,53 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no T3 e $1543,32 \pm 495,29 \mu\text{mol/min/mg/proteína}$ no T4, conforme demonstrado na figura 17C. Dessa forma, é possível destacar que houve um aumento significativo (Tukey, $p < 0,05$) na atividade da catalase do CP em relação ao CN.

Em relação a GST, foram observados níveis médios de $6615,41 \pm 2237,10$ nmol/min/mg/proteína no CN, $11754,73 \pm 4147,09$ nmol/min/mg/proteína no CP, $8702,69 \pm 3096,65$ nmol/min/mg/proteína no T1, $7650,55 \pm 2636,78$ nmol/min/mg/proteína no T2, $9376,81 \pm 3403,29$ nmol/min/mg/proteína no T3 e $5145,68 \pm 4421,62$ nmol/min/mg/proteína no T4, conforme evidenciado na figura 17D. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (Tukey, $p > 0,05$) em relação a comparação da atividade da GST entre os grupos.

Figura 17 - Mensuração dos níveis médios e desvio padrão do efeito oxidativo nos olhos de peixes zebrafish. A. Mensuração das espécies reativas de oxigênio (EROs). B. Mensuração da enzima superóxido dismutase (SOD). C. Mensuração da enzima catalase (CAT). D. Mensuração da enzima glutatona S-transferase (GST).



Fonte: Autor (2025).

Em relação a dimensão do efeito nos parâmetros que evidenciaram diferenças estatísticas acerca da utilização do composto nos grupos testes, observou-se em relação as EROs e a SOD impacto enorme nos grupos T1 e T2 (d de Cohen $> 2,00$), e muito grande no T3 e T4 (d de Cohen $> 1,20$ e $< 2,00$), conforme evidenciado na tabela 8.

Tabela 8 - Dimensão de efeito dos grupos testes em comparação ao controle positivo quando aos parâmetros da resposta oxidativa que houve diferenças estatísticas evidenciadas.

Parâmetro	Comparação		D de Cohen	Intervalo de confiança a 95%		Dimensão de efeito
	Grupo	Grupo		Lim. inferior	Lim. superior	
Espécies reativas de oxigênio	C. positivo	G. Teste 1	2,05	0,61	3,49	Enorme
		G. Teste 2	2,05	0,61	3,49	Enorme
		G. Teste 3	1,96	0,53	3,39	Muito grande
		G. Teste 4	1,23	-0,12	2,59	Muito grande
Superoxido dismutase	C. positivo	G. Teste 1	2,34	0,86	3,82	Enorme
		G. Teste 2	2,42	0,93	3,91	Enorme
		G. Teste 3	1,96	0,53	3,39	Muito grande
		G. Teste 4	1,51	0,13	2,89	Muito grande

Fonte: Autor (2025).

Dessa forma, esses achados demonstram que a princípio o modelo de retinopatia diabética em zebrafish também apresenta um mecanismo oxidativo na doença, evidenciado pelo aumento significativo das espécies reativas de oxigênio e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no grupo CP em relação ao CN, indicando um estado de estresse oxidativo. Característica essa associada aos dados morfológicos e morfométricos observados no presente trabalho e em trabalhos anteriores como Alvarez et al. (2010), Gleeson, Connaughton e Arneson (2007) e Tanvir et al. (2018), sugerem que semelhante ao observado em mamíferos o modelo zebrafish também posso ter o mecanismo oxidativo intimamente correlacionado a neurodegeneração. Entretanto, ressalta-se que mais estudos são necessários para a confirmação desse mecanismo na espécie e para o aprofundamento sobre sua correlação com os tipos de morte celular e se as vias para sua ocorrência são as mesmas dos mamíferos.

Além disso, os resultados também evidenciam que a utilização do ozônio nos grupos T1 a T3 proporcionou uma diminuição dos EROs e da SOD, indicando que houve um controle do estresse oxidativo observado no CP, uma vez que esses dois parâmetros estão estatisticamente semelhantes ao CN e reduzidos em comparação ao CP, com destaque aos grupos T1 e T2 que obtiveram efeitos mais expressivos em relação aos parâmetros do que os demais grupos. Tais dados associados aos resultados morfométricos dos mesmos grupos testados, reforçam que o mecanismo oxidativo está associado a neurodegeneração, e que seu controle também leva a

melhores parâmetros morfométricos, algo semelhante foi relatado por Kal et al., (2017), que utilizou o ozônio em modelos de isquemia retiniana em roedores, e observou que o composto reduz os danos isquêmicos provavelmente pelo aumento da capacidade antioxidante observada pela mensuração de enzimas antioxidantes no sangue. Segundo a literatura, o ozônio apresenta efeitos antioxidantes a partir da geração do H_2O_2 e principalmente do 4-HNE, que estimulam a via Nrf2, rota que é fundamental para as reações redox intracelulares e o equilíbrio inflamatório, vias essas que se sabe que estão comprometidas na retinopatia diabética (BOCCI; VALACCHI, 2015; CLAVO et al., 2019). Baseando-se nisso, os resultados observados permitem a geração da hipótese de que a via Nrf2 também possa estar sendo estimulada nos grupos testados, e dessa forma, indica-se que novos estudos aprofundados nesse mecanismo possam ser realizados.

Quando aos resultados observados no grupo T4, observou-se que o estado de estresse oxidativo assemelha-se estatisticamente do CP e diferencia-se dos demais grupos, indicando que não houve um controle adequado do mecanismo oxidativo, situação essa que associada aos dados morfométricos do mesmo grupo correlaciona-se a maior diminuição da RNS e de suas camadas, indicando maior neurodegeneração. Dessa forma, reforça-se a hipótese gerada anteriormente, na qual houve um excesso do composto e conseqüentemente dos produtos oxidantes formados pelo mesmo, entretanto, provavelmente essas alterações estejam mais relacionadas a frequência de aplicação, uma vez que o T3 utilizou a mesma dosagem de 0,072 mg/L uma vez ao dia, enquanto o T4 foi submetido a aplicação duas vezes ao dia, (BOCCI, 2004; LIU et al., 2023). Ressalta-se que o T3 e T4 apresentaram dimensão de efeito sobre os parâmetros menos evidentes do que os demais grupos testes. Dessa forma, indica-se que futuros trabalhos acerca do uso do composto para o controle da doença no mesmo modelo limitam-se a utilizar protocolos de com 0,052 mg/L.

6. CONCLUSÃO

Baseando-se nos achados evidenciados, conclui-se que os protocolos de exposição de ozônio via água propostos são seguros quando sua aplicabilidade e influência sobre a saúde branquial e retiniana de peixes *Danio rerio* hípidos, dessa forma, é possível indicar a sua utilização em ensaios oculares com foco em retinopatias na espécie em questão.

Quanto ao modelo de retinopatia diabética na espécie, o presente trabalho infere que o mesmo proporciona um mecanismo oxidativo semelhante ao evidenciado em mamíferos, e que

ele esteja correlacionado ao processo degenerativo retiniano, dessa forma, indica-se a realização de novos estudos para o aprofundamento do entendimento desse processo.

Em relação a utilização dos protocolos com o composto no modelo da doença, conclui-se que o O₃ proporcionou de forma dose-dependente um controle do mecanismo oxidativo e do processo neurodegenerativo retiniano, provavelmente por influência do estresse oxidativo nas vias de morte celular que acarretam no processo degenerativo, dessa forma, indica-se a realização de novos estudos que possam evidenciar primeiramente se o modelo da doença desencadeia essas vias, e posteriormente se o composto tem influência sobre as mesmas. Ressalta a influência da dose sobre esses achados, uma vez que também evidenciou-se que o O₃ em concentrações elevadas como no grupo teste 4 esses efeitos benéficos do ozônio não foram evidenciada, indicando um provável efeito colateral. Além disso, infere-se que dentre os protocolos utilizados, a aplicação de 52 µg/ml uma vez ao dia foi a mais eficiente no controle do estado oxidativo e principalmente no quadro degenerativo retiniano.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems - Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.
- ALI, Z. et al. Photoreceptor degeneration accompanies vascular changes in a zebrafish model of diabetic retinopathy. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 61, n. 2, 2020.
- ALVAREZ, Y. et al. Predominant cone photoreceptor dysfunction in a hyperglycaemic model of non-proliferative diabetic retinopathy. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 3, n. 3–4, p. 236–245, 2010.
- ANTONETTI, D. A.; SILVA, P. S.; STITT, A. W. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 4, p. 195–206, 2021.
- BARODIA, S. K.; CREED, R. B.; GOLDBERG, M. S. Parkin and PINK1 functions in oxidative stress and neurodegeneration. **Brain Research Bulletin**, v. 133, p. 51–59, 2017.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.
- BOCCI, V. Como o ozônio atua e exerce efeitos terapêuticos. In: **Ozone: The revolution in Dentistry**. Londres: Quintessence Books, cap. 1.1, p. 15–22, 2004.
- BOCCI, V. A. Tropospheric Ozone Toxicity vs. Usefulness of Ozone Therapy. **Archives of Medical Research**, v. 38, n. 2, p. 265–267, 2007.

BOCCI, V.; VALACCHI, G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. FEB, p. 1–6, 2015.

BOSCO, A. et al. Diabetic retinopathy. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 49, n. 2, p. 217–227, 2005.

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

BRAIDY, N. et al. Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: Focus on diabetes and spinal pain. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2705–2714, 2018.

CAO, R. et al. Hypoxia-induced retinal angiogenesis in zebrafish as a model to study retinopathy. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 1–9, 2008.

CAPIOTTI, K. M. et al. Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 171, n. 1, p. 58–65, 2014.

CASSAR, S. et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95–118, 2020.

CHAGAS, T. A. et al. Prevalence of diabetic retinopathy in Brazil: a systematic review with meta-analysis. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2023.

CHHETRI, J.; JACOBSON, G.; GUEVEN, N. Zebrafish-on the move towards ophthalmological research. **Eye (Basingstoke)**, v. 28, n. 4, p. 367–380, 2014.

CLAVO, B. et al. Modulation of oxidative stress by ozone therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced toxicity: Review and prospects. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, 2019.

CONNAUGHTON, V. P. et al. Alternate Immersion in an External Glucose Solution Differentially Affects Blood Sugar Values in Older Versus Younger Zebrafish Adults. **Zebrafish**, v. 13, n. 2, p. 87–94, 2016.

CULLEN, C. L.; WEBB, A. A. Ocular manifestations of systemic disease Part 1: the dog. In: **Veterinary Ophthalmology**. p. 1897–1977, 2021.

DI ROSA, M. et al. Autophagy in Diabetic Retinopathy. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 8, p. 810–825, 2016.

DRIVER, A. S.; KODAVANTI, P. R. S.; MUNDY, W. R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, n. 2, p. 175–181, 1 Mar. 2000.

DUH, E. J.; SUN, J. K.; STITT, A. W. Diabetic retinopathy: Current understanding, mechanisms, and treatment strategies. **JCI Insight**, v. 2, n. 14, p. 1–13, 2017.

DÜZGÜN, E. et al. Ozone-induced retinal vascular reactivity as assessed by optical

coherence tomography angiography. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 39, n. May, 2022.

ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 66–70, 2011.

FEENSTRA, D. J.; YEGO, C.; MOHR, S. Modes of Retinal Cell Death in Diabetic Retinopathy. **Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 04, n. 05, 2013.

FERNANDES, A. G. et al. Diabetic retinopathy screening and treatment through the Brazilian National Health Insurance. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2022.

FUNG, T. H. M. et al. Diabetic retinopathy for the non-ophthalmologist. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 22, n. 2, p. 112–116, 2022.

GLEESON, M.; CONNAUGHTON, V.; ARNESON, L. S. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. **Acta Diabetologica**, v. 44, n. 3, p. 157–163, 2007.

GOLDMAN, D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 431–442, 2014.

GONÇALVES, A. A.; GAGNON, G. A. Ozone application in recirculating aquaculture system: An overview. **Ozone: Science and Engineering**, v. 33, n. 5, p. 345–367, 2011.

GORSUCH, R. A.; HYDE, D. R. Regulation of Müller glial dependent neuronal regeneration in the damaged adult zebrafish retina. **Experimental Eye Research**, v. 123, n. July, p. 131–140, 2014.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, n. C, p. 398–405, 1981.

HAYASHI, M. P.; FRIOLANI, M. Aplicabilidade clínica cirúrgica da ozonioterapia em pequenos animais: revisão de literatura. **Unimar Ciências**, v. 27, n. 1–2, p. 88–100, 2018.

HONG, Y.; LUO, Y. Zebrafish model in ophthalmology to study disease mechanism and drug discovery. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 8, 2021.

İNAL, M. et al. The effects of ozone therapy and coenzyme Q 10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. **Irish Journal of Medical Science**, v. 180, n. 3, p. 703–707, 2011.

JINXING, L.; QIUSHENG, C.; JIANHUA, H. **Color Atlas of Zebrafish Histology and Cytology**. 2022.

KAL, A. et al. The protective effect of prophylactic ozone administration against retinal ischemia-reperfusion injury. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 36, n. 1, p. 39–47, 2017.

KERN, T. S.; ENGERMAN, R. L. Vascular lesions in diabetes are distributed non-uniformly within the retina. **Experimental Eye Research**, v. 60, n. 5, p. 545–549, 1995.

KIM, H. S. et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. **Journal of Korean Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 368–374, 2009.

KOWLURU, R. A.; ZHONG, Q.; SANTOS, J. M. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: Potential role of MMP-9. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 6, p. 797–805, 2012.

LANDRY, M. P.; HERRING, I. P.; PANCIERA, D. L. Funduscopy findings following cataract extraction by means of phacoemulsification in diabetic dogs: 52 Cases (1993-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 5, p. 709–716, 2004.

LECHNER, J.; O'LEARY, O. E.; STITT, A. W. The pathology associated with diabetic retinopathy. **Vision Research**, v. 139, p. 7–14, 2017.

LINK, B. A.; COLLERY, R. F. Zebrafish Models of Retinal Disease. **Annual Review of Vision Science**, v. 1, n. 1, p. 125–153, 2015.

LIU, L. et al. Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. **International Wound Journal**, v. 20, n. 6, p. 2376–2385, 2023.

LIU, X. Effect of ozone therapy on cell apoptosis and angiogenesis in retina tissue of diabetic retinopathy rats. **Journal of Hainan Medical University**, v. 22, n. 10, p. 1–4, 2016.

LODD, E. et al. The combination of loss of glyoxalase1 and obesity results in hyperglycemia. **JCI Insight**, v. 4, n. 12, p. 1–17, 2019.

MANOTO, S. L.; MAEPA, M. J.; MOTAUNG, S. K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 672–679, 2018.

MCLELLAN, G. J.; NARFSTROM, K. The fundus. In: **British Small Animal Veterinary Association (BSAVA)**. 3. ed, cap 18, p. 322–356, 2016.

MENKE, A. L. et al. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 5, p. 759–775, 2011.

MIDDEL, C. S.; HAMMES, H. P.; KROLL, J. Advancing diabetic retinopathy research: Analysis of the neurovascular unit in zebrafish. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2021.

MONTEIRO, K. S. **Effects of ozone on zebrafish (Danio rerio) maintained in recirculation water system**. Federal University of Lavras, 2022.

MUÑANA, K. R. Long-term complications of diabetes mellitus, part I: retinopathy, nephropathy, neuropathy. **The Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 25, n. 3, p. 715–730, 1995.

OLSEN, A. S.; SARRAS, M. P.; INTINE, R. V. Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus. **Wound Repair and Regeneration**, v. 18, n. 5, p. 532–542, 2010.

OLVERA-MONTAÑO, C. et al. Oxidative Stress as the Main Target in Diabetic Retinopathy Pathophysiology. **Journal of Diabetes Research**, v. 2019, 2019.

PEREIRA, J. A. et al. Atualizações sobre retinopatia diabética: uma revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 49, p. e3428, 2020.

PETERSEN-JONES, S. M.; MOWAT, F. Diseases of the Canine Ocular Fundus. In: **Veterinary Ophthalmology**. 6 ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, cap. 25, p. 1477–1574, 2020.

PLATEK, A. et al. Environmental calcium regulates gill remodeling in a euryhaline teleost fish. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 327, n. 2–3, p. 139–142, 2017.

RICHARDSON, R. et al. The zebrafish eye-a paradigm for investigating human ocular genetics. **Eye (Basingstoke)**, v. 31, n. 1, p. 68–86, 2017.

RÜBSAM, A.; PARIKH, S.; FORT, P. E. Role of inflammation in diabetic retinopathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–31, 2018.

SAWILOWSKY, S. S. New effect size rules of thumb. **Journal of Modern Applied Statistical Methods**, v. 8, n. 2, p. 597–599, 2009.

SCIORSI, R. L. et al. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 240–246, 2020.

SMITH, N. et al. Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, v. 7, n. 3, p. 212–219, 2017.

SONG, Y. et al. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 905–909, 2009.

STILLER, K. T. et al. The effects of ozone on Atlantic salmon post-smolt in brackish water—establishing welfare indicators and thresholds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–17, 2020.

TAN, T. E.; WONG, T. Y. Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, n. January, p. 1–8, 2023.

TANG, J.; KERN, T. S. Inflammation in diabetic retinopathy. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 30, n. 5, p. 343–358, 2011.

TANVIR, Z. et al. **One month of hyperglycemia alters spectral responses of the zebrafish photopic electroretinogram**. v. 11, n. 10, 2018

TANVIR, Z. et al. One month of hyperglycemia alters spectral responses of the zebrafish photopic electroretinogram. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 11, n. 10, 2018b.

TARR, J. M. et al. Pathophysiology of diabetic retinopathy. **ISRN Ophthalmology**, 2013.

VALACCHI, G.; BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. **Mediators of Inflammation**, v. 9, n. 6, p. 271–276, 2000.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002.

XIAO, W. et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 6, 2017.

XIAO, W. R.; WU, M.; BI, X. R. Ozone oil promotes wound healing via increasing miR-21-5p-mediated inhibition of RASA1. **Wound Repair and Regeneration**, v. 29, n. 3, p. 406–416, 2021.

XIE, T. Y. et al. Effect of ozone on vascular endothelial growth factor (VEGF) and related inflammatory cytokines in rats with diabetic retinopathy. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, p. 1–11, 2016.

ZIMMERMANN, M. J. Y. et al. Zebrafish Differentially Process Color across Visual Space to Match Natural Scenes. **Current Biology**, v. 28, n. 13, p. 2018- 2032.e5, 2018.