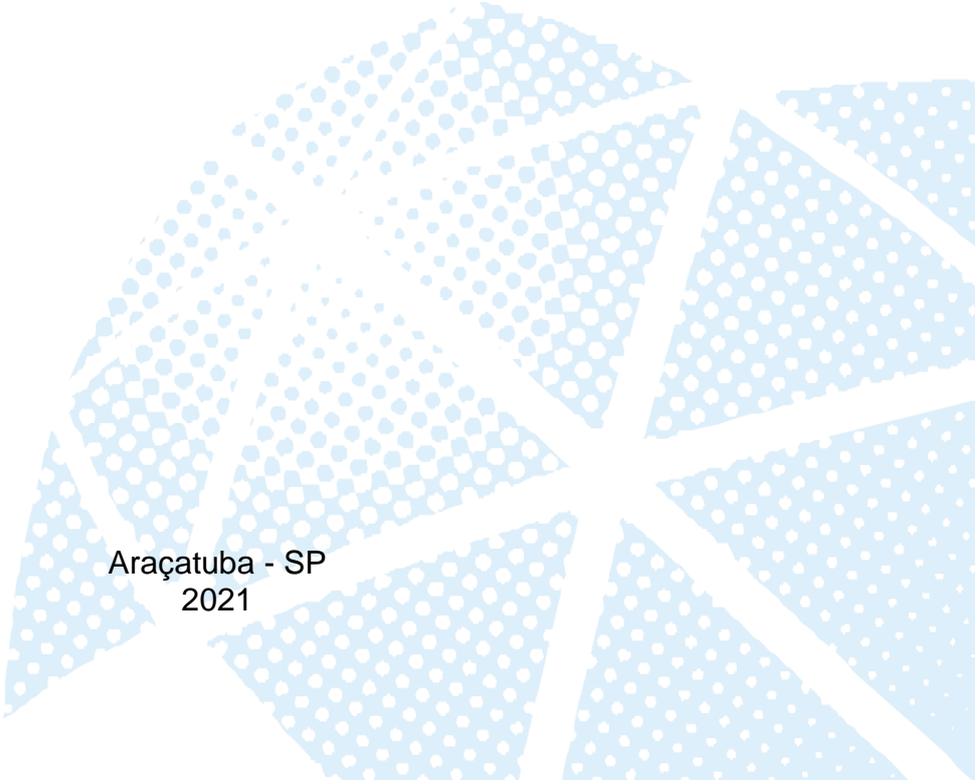


TIBURTINO JOSÉ DE LIMA NETO

**Análise da dinâmica do tecido ósseo
mandibular, colo de fêmur e coluna vertebral
de ratas com osteoporose induzida tratadas
com ácido zoledrônico e administração
sistêmica de ozônio**

Araçatuba - SP
2021



TIBURTINO JOSÉ DE LIMA NETO

**Análise da dinâmica do tecido ósseo
mandibular, colo de fêmur e coluna vertebral
de ratas com osteoporose induzida tratadas
com ácido zoledrônico e administração
sistêmica de ozônio**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial)

Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

Coorientador: Prof. Associado Edilson Ervolino

Araçatuba - SP
2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

L732a Lima Neto, Tiburtino José de.
Análise da dinâmica do tecido ósseo mandibular, colo de fêmur e coluna vertebral de ratas com osteoporose induzida tratadas com ácido zoledrônico e administração sistêmica de ozônio / Tiburtino José de Lima Neto. . – Araçatuba, 2021
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Osteoporose 2. Regeneração óssea 3. Ozônio I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Dedico este trabalho do as pessoas que mudaram a minha vida.

A **Deus** pela sua infinita bondade e paciência com seu filho, livrando de todas as maldades do mundo e guiando para o caminho da luz.

À minha mãe, **Nelizete Pires de Lima Dias**, a pessoa mais importante da minha vida, quem dedicou de forma exemplar ao desenvolvimento do seu filho com amor, carinho e cuidado. Seu exemplo de determinação norteia a minha vida, pois sei que seguindo seu exemplo colherei bons frutos no futuro.

Ao meu pai, **José Neviton Dias de Almeida** (*in memoriam*) sua presença sempre foi notada e a sua falta sempre foi sentida, eu sei que olhas para seu filho com amor, carinho e cuidado. Pai, eu amo você.

À minha avó, **Eunice Pires de Lima**, a definição suprema de amor, a sua presença em minha vida me fez entender o real significado do amor dos avós, eu espero um dia desfrutar da alegria de ser avô e poder ser pelo menos a metade da pessoa que você representa.

Ao meu tio, **Neliton Pires de Lima**, esse título será seu, o senhor me amparou no momento mais difícil, o momento de transição, o momento que encarei o novo. Eu não tenho palavras para agradecer a oportunidade que o senhor me deu de viver tudo que vivi em Araçatuba.

Agradecimentos

especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por sua infinita bondade e por sempre me colocar nos locais certos com as pessoas certas, compreender os desígnios de Deus é sempre complicado, porém sua presença é sempre percebida e louvada, pois sempre me direciona para o caminho correto.

À minha mãe, **Nelizete Pires de Lima Dias**, eu não tenho palavras para agradecer a Deus pela sua presença em minha vida, obrigado pelo apoio irrestrito na caminhada, na decisão de sair de casa e na caminhada da pós graduação, a separação foi difícil para ambos, mas saiba que meus pensamentos e minhas orações estão sempre com você e que com os frutos da pós graduação irei ajudar da melhor maneira possível. Mãe, eu te amo.

À minha avó, **Eunice Pires de Lima**, mesmo na distância sua presença é percebida, carinho, afeto e amor são as palavras que definem a senhora.

Aos meus tios **Neliton Pires de Lima e Marinez Soares**, eu não tenho e não terei palavras para agradecer o apoio na jornada para Araçatuba, eu não tenho dúvida que sem vocês eu não conseguiria, minha eterna gratidão pelo apoio e carinho.

À minha namorada, **Rayanne Helen do Nascimento Silva**, obrigado pela parceria de anos, paciência e cuidado comigo e com todos da minha família. Sua presença ilumina o caminho de todos. Eu amarei você para sempre.

Ao meu orientador, **Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**, o senhor foi realmente um presente de Deus em minha vida. Nos primeiros momentos, eu já percebi sua grandeza, no cuidado com a minha mudança, onde ficaria, como ficaria e já me orientando nas pequenas coisas. Eu nunca esquecerei o apoio e cuidado, palavras são insuficientes para agradecer, sem dúvida ganhei mais que um orientador, eu ganhei um grande amigo que levarei por toda a minha vida. Sem dúvida é um enorme prazer viver e trabalhar ao seu lado.

Ao meu grande coorientador, **Prof. Edilson Ervolino**, muito obrigado pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, a sua atenção mesmo nos momentos mais difíceis fez total diferença e sem você seria impossível a realização deste trabalho.

À **profa. Daniela Ponzoni**, seu jeito sereno e quieto mostram a sabedoria de quem entende os ciclos da vida, trabalho firme e muitas vezes solitário definem a senhora, infelizmente não tive a oportunidade de desfrutar de tão perto a sua companhia e seu conhecimento, mas sei de sua grandiosidade, obrigado por aceitar participar deste momento ímpar em minha vida.

À **profa. Ana Paula Farnezi Bassi**, uma das maiores honras que tive no mestrado foi trabalhar ao seu lado, detentora de um conhecimento ímpar, sempre está disposta a ajudar e orientar, muito obrigado pelos ensinamentos.

Ao **prof. Aníbal Henrique Barbosa Luna**, ter o senhor na minha defesa de dissertação de mestrado é uma grande honra, significa muito a sua presença, pois grande parte da minha formação cirúrgica e pessoal vem do contato com o senhor, agradeço cada palavra de atenção e elogio durante a jornada, eu não tenho como agradecer.

Aos **demais** Professores da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial **Idelmo Rangel Garcia Junior, Osvaldo Magro Filho, Alessandra Marcondes Aranega e Francisley Ávila Souza**, pelo carinho, coleguismo, auxílio, exemplo e amizade desfrutada em nosso departamento. Recebam o meu carinho e admiração

Ao meu amigo, **Anderson Maikon de Sousa Santos**, um amigo que me acompanhou na jornada da Paraíba para Araçatuba sem você tudo seria mais difícil, obrigado pela parceria e companheirismo.

Ao irmão que ganhei em Araçatuba, **Gustavo Antônio Correia Momesso**, grande amigo, um irmão, foi uma hora passar esses dois anos ao seu lado, ser humano ímpar, capaz de fazer tudo por todos.

Ao meu amigo, **William Phillip Pereira da Silva**, um grande parceiro de pós-graduação, você com seu jeito engraçado e descontraído consegue conquistar a todos, passamos por momentos difíceis, foi uma grande hora trabalhar esses dois anos ao seu lado.

A minha amiga, **Barbara Ribeiro Rios**, amizade inesperada que espero que perdure por anos, você se tornou grande na pós-graduação e sem dúvidas será uma grande profissional, obrigado pela parceria nos momentos bons e ruins.

A minha amiga, **Stefany Barbosa**, você é simplesmente um exemplo, um exemplo de filha, aluna e amiga, eu não tenho como agradecer a parceria e acima de tudo o companheirismo, você certamente terá um futuro brilhante e com toda certeza iremos nos encontrar nos congressos e relembrar tudo que vivemos.

Ao meu amigo, **João Mateus**, pessoa do bem, coração bom e tranquilo, eu sou grato por todos os momentos com você, eu tenho certeza de que sua trajetória será repleta de inúmeras vitórias, obrigado por tudo.

À minha grande amiga Kim Henderson, você se tornou importante aos poucos e essencial para enfrentar os períodos mais difíceis da pós-graduação. Obrigado por tudo.

A todos os alunos de iniciação científica e integrantes do grupo de pesquisa que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e dos demais trabalhos com ideias, técnicas e experiências, vocês junto com os amigos da pós graduação são a minha família em Araçatuba, uma das maiores honras da minha vida é desfrutar cada momento com vocês, espero continuar aprendendo e ensinando o pouco que sei: **Maria Eloise, Leonardo Perazza, Marcos Aurélio, Mirela, Monique Gonçalves, Natalia Pereira, Luiza Grando, Mônica Souza, Victor Sachi,, Milena Buzo, Ítalo Raphael, Cauê Paizan, Jessica Euzébio, Gabi Baccaro, Pedro Augusto e Marcela Prado**

Ao amigo **Eduardo Dallazen**, você com seu jeito tranquilo e sempre disposto a ajuda faz com que todos queiram sua amizade, obrigado pela parceria.

Ao amigo **Mateus Pavelski**, pessoa de coração bom sempre disposta a ajudar, obrigado pela amizade e parceria.

Ao amigo **Vinicius Bizelli**, você é a definição de uma pessoa boa, sua energia desperta alegria e felicidade por onde passa, uma grande alegria conviver com você.

Ao grande **Valthierre Nunes**, você meu amigo tem um papel fundamenta na minha vinda para Araçatuba, seu exemplo é lembrado por muitos e encontrar você no COBRAC de 2017 em São Paulo me deu motivação para buscar a FOA, muito obrigado por toda a paciência e estímulo.

Ao grande **Tárik Polo**, sua contribuição para o meu desenvolvimento é inestimável, mesmo sem sua presença física aqui na faculdade, eu sei das suas inúmeras contribuições, muito obrigado.

Ao grande amigo, **Bruno Coelho**, você é um exemplo de superação e de força de vontade, a cada conversa com você eu tenho a total percepção que devo reclamar menos, trabalhar mais e agradecer mais ainda, eu tenho certeza de que o seu caminho será repleto de grandes realizações.

Ao grande amigo, **Cristian Statkievicz**, você foi uma agradável surpresa que a pós graduação me deu, pessoa de mente aberta e sempre pronto para ajudar o próximo, eu espero que nossa amizade perdure por anos.

Aos colegas de pós graduação **Jaqueline Hassumi, Leonardo Delanora, Letícia Pitol, Nátalia Siqueira, Karem Rawen, Naara Monteiro, Laís Kawamata, Carol Bacelar, Jonathas Piassi, Cecília Alves de Souza, Cassio Messias Beija-Flor Figueiredo, Luara Colombo, Lara Cervantes, Henrique Haddad, Rodrigo Capalbo, Lais Sara Hegas, Fábio Vieira, Ana Flávia Piquera Santos.**

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP*, na pessoa do diretor **Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara** pela oportunidade de realização do curso Mestrado. Devo tudo o que conquistei, principalmente a esta universidade que me proporcionou os melhores ensinamentos, professores e estrutura que poderia ter. Sou eternamente grato à FOA-UNESP.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador **Prof. Associado André Luiz Fraga Briso**.

Aos funcionários da Pós-graduação da *Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP*, **Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos, Lilian Sayuri Mada**, pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do mestrado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** pela prontidão em nos atender e carinho.

Aos **funcionários da Universidade Marco Aurélio de Oliveira Ianner, Renato Gomes de Oliveira, Paulo Roberto Gratão e Fausto Daniel de Oliveira Canuto**, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade, ajuda exercem na realização de todos os projetos. Sem os seus ensinamentos, nada disso seria possível. Recebam minha gratidão.

Ao Laboratório e grupo de pesquisa do **professor Edilson Ervolino**, com especialidade para as alunas de iniciação científica e para o pós-graduando **Luan Toro** que sempre nos ajudaram nas análises dos tecidos descalcificados. Fica nossa gratidão.

Aos **pacientes**, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente. Minha eterna gratidão.

Aos nossos queridos **Animais** “in memoriam”, obrigado por doar o bem mais importante, a vida, por uma causa nobre. Minha eterna gratidão e carinho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001, pela concessão da Bolsa de Mestrado durante todo o curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro durante o segundo ano de curso e com isso, permitir que fosse possível a realização do mestrado.

Epígrafe

“...quem quiser tornar-se importante entre vocês deverá ser servo; e quem quiser ser o primeiro deverá ser escravo de todos. Pois nem mesmo o Filho do homem veio para ser servido, mas para servir e dar a sua vida em resgate por muitos”.

Marcos 10:42-45

Lima Neto TJ. Análise da dinâmica do tecido ósseo mandibular, colo de fêmur e coluna vertebral de ratas com osteoporose induzida tratadas com ácido zoledrônico e administração sistêmica de ozônio [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2021.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial da terapia com ozônio na dinâmica do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas tratadas com ácido zoledrônico. Para tanto, 110 ratas Wistar, fêmeas, 6 meses de idade foram submetidas à ovariectomia bilateral (Ovx). Após três meses, dez animais foram submetidos à eutanásia para caracterização da arquitetura do tecido ósseo em microtomografia (Micro ct), os animais restantes foram divididos em dois grupos, o grupo ZOL e o grupo SAL e foi iniciado o tratamento nos animais do grupo ZOL com ácido zoledrônico (100 µg/Kg/28 dias) e, no grupo SAL foi administrado 0,45 ml de solução salina usando o mesmo protocolo do ZOL. Após três meses desta terapia, 10 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para caracterização da arquitetura óssea (Micro-ct) e os animais restantes foram novamente divididos aleatoriamente, em que os animais do grupo ZOL foram subdivididos em ZOL (n=20) e ZOL+OZN (n=20) e, os animais dos grupos SAL foram subdivididos em SAL (n=20) e SAL+OZN (n=20). Após este procedimento foi iniciada a ozonioterapia em concentração de 0,7mg/kg a cada dois dias até o final do experimento. Após 30 e 60 dias do início da terapia com ozônio, seis animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para a análise e caracterização estrutural óssea das regiões de mandíbula, cabeça femoral e coluna vertebral. Uma parte das peças correspondentes ao colo femoral foram destinadas a testes biomecânicos. As demais amostras coletadas foram descalcificadas e as lâminas histológicas foram coradas em hematoxilina e eosina para a análise histométrica (área de osso neoformado), contagem de células inflamatórias (linfócitos) e contagem de osteócitos. Os órgãos do metabolismo e absorção como mesentério, fígado, rins, pulmão e cérebro foram removidos para a avaliação do infiltrado inflamatório e ou qualquer proliferação celular desordenada. Para os parâmetros quantitativos de porcentagem de tecido ósseo na região de cabeça femoral e mandíbula, o teste ANOVA-2 fatores (grupos vs períodos de análise) foi aplicado e em seguida o pós-teste Tukey, quando $p < 0,05$. Já este parâmetro na coluna vertebral, o teste ANOVA-1 fator (grupos experimentais, somente no período de 30 dias) foi aplicado e pós-teste de Tukey. Em todos os testes foi considerado $p < 0,05$. O tratamento com ácido zoledrônico e ozônio (ZOL+OZN) apresentou maior porcentagem de volume ósseo, maior número de osteócitos e maior número de células inflamatórias na região de cabeça femoral,

mandíbula com resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Na análise biomecânica do colo femoral, o módulo de elasticidade foi semelhante para os grupos ZOL e ZOL+OZN ($p > 0,05$), em comparação aos grupos SAL e SAL+OZN ($p < 0,05$). Este estudo *in vivo* mostrou que existe um efeito sinérgico entre o ozônio e o ácido zoledrônico com manutenção da massa óssea e restauração da vitalidade do tecido ósseo em ratas ovariectomizadas. Além disso, que a terapia com ozônio foi segura no modelo experimental proposto nesta investigação.

Palavras-chave: Osteoporose. Regeneração óssea. Ozônio.

Lima Neto TJ. Analysis of the dynamics of mandibular bone tissue, femoral neck and spine of rats with induced osteoporosis treated with zoledronic acid and systemic administration of ozone [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2021

ABSTRACT

This work aimed to analyze the potential of ozone therapy in the bone tissue dynamics of ovariectomized rats treated with zoledronic acid. For this purpose, 110 Wistar rats, schoolchildren, 6 months old, underwent bilateral ovariectomy (Ovx). After three months, ten animals were euthanized to characterize bone tissue architecture in microtomography (Micro-ct). The remaining animals were divided into two groups: the ZOL group, the SAL group, and treatment was started on the animals in the group. ZOL with zoledronic acid (100 µg / Kg / 28 days) and no SAL group was administered 0.45 ml of saline using the same protocol as ZOL. After three months of this therapy, 10 animals from each group were euthanized to characterize the bone architecture (Micro-ct), and the remaining animals were again randomly divided, in which the animals in the ZOL group were subdivided into ZOL (n = 20) and ZOL + OZN (n = 20) and, the animals in the SAL groups were subdivided into SAL (n = 20) and SAL + OZN (n = 20). After this procedure, ozone therapy was obtained at a concentration of 0.7 mg/kg every two days until the end of the experiment. After 30 and 60 days from the beginning of ozone therapy, six animals from each group were found to be euthanized for analysis and structural bone characterization of the mandible, femoral head, and spine regions. A part of the pieces corresponding to the cervix was destined for biomechanical tests. The others collected were decalcified, and histological slides were stained in hematoxylin and eosin for histometric analysis (area of newly formed bone), inflammatory cell count (lymphocytes), and osteocyte count. The metabolism and absorption organs such as mesentery, liver, kidneys, lung, and brain were removed to evaluate inflammatory infiltrate and or any disorderly cell proliferation. For the quantitative parameters of the percentage of bone tissue in the femoral head and mandible region, the ANOVA-2 factor test (groups vs analysis periods) was provided and then the Tukey post-test, when $p < 0.05$. Already this parameter in the spine, the ANOVA-1 factor test (experimental groups, only in the period of 30 days) was applied and Tukey's post-test. In all tests, $p < 0.05$ was considered. Treatment with zoledronic acid and ozone (ZOL + OZN) showed a higher percentage of bone volume, a greater number of osteocytes, and a greater number of inflammatory cells in the femoral head and mandible region with statistically significant results ($p < 0.05$). In the biomechanical

analysis of the femoral neck, the modulus of elasticity was similar for the ZOL and ZOL + OZN groups ($p > 0.05$), compared to the SAL and SAL + OZN groups ($p < 0.05$). This in vivo study revealed a synergistic effect between ozone and zoledronic acid with the maintenance of bone mass and restoration of bone tissue vitality in ovariectomized rats. Furthermore, that ozone therapy was safe in the experimental model proposed in this investigation.

Keywords: Osteoporosis. Bone regeneration. Ozone.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Esquema representativo da linha do tempo do estudo, observa-se período de caracterização, divisão dos grupos e períodos de eutanásia..... 29
- FIGURA 2 - Esquema representativo do início e os intervalos de aplicação do ácido zoledrônico nos animais participantes dos grupos ZOL e ZOL+ OZN..... 31
- FIGURA 3 - Esquema representativo do início e os intervalos de aplicação do ozônio nos animais participantes dos grupos SAL+OZN e ZOL+ OZN..... 32
- FIGURA 4 - Figura representativa da reconstrução micro tomográfica dos grupos CAR, SAL e ZOL, observa-se uma diminuição das trabéculas e aumento das corticais no osso da região de cabeça feral dos grupos ZOL em relação ao CAR e SAL..... 33
- FIGURA 5 - Representação gráfica da micro tomografia da região de cabeça femoral dos animais da caracterização, observa-se diferenças estatisticamente significativa entre o grupo CAR e os grupos SAL e ZOL nos parâmetros (BV.TV/Tb.Th) (d, a), no parâmetro Po.Tot (e) os grupos SAL e ZOL apresentaram diferença estatisticamente significante em comparação ao grupo CAR..... 34
- FIGURA 6 - Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de cabeça femoral, nos grupos SAL (a, f), ZOL (b,f), SAL+OZN (c, g), ZOL+ OZN (d, h) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. No período de 30 dias (a, c, d, e), o grupo ZOL+OZN apresentou maior área de tecido ósseo em comparação com SAL (a), ZOL (b) e SAL+OZN (c). Já o grupo ZOL (b) apresentou resultados mais significativos em comparação ao grupo SAL (a) e SAL+OZN (c). No período de 60 dias, o grupo ZOL+OZN (h) apresentou resultado promissor em comparação ao grupo SAL (e) e SAL+OZN (g). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 40x. Escala aplicada 100 μ m..... 40
- FIGURA 7 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região de cabeça femoral representado em porcentagem de tecido ósseo. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observa-se no período de 30 dias diferença estatisticamente significativo entre os grupos ZOL+OZN e os grupos SAL, ZOL e SAL+OZN (ϵ , ξ , ζ), o grupo ZOL apresentou diferença estatisticamente relevante quando comparado ao grupo SAL e SAL+OZN (α , β). No período de 60 dias notou-se diferença estatística entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (μ , π) 41

FIGURA 8 - Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de coluna vertebral, nos grupos SAL (a), ZOL (b), SAL+OZN (c), ZOL+ OZN (d) nos períodos de 30 (a, b, c, d). Observou-se maior área de tecido ósseo no grupo ZOL+OZN (d) em comparação ao grupo SAL(a). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 40x. Escala aplicada 100µm..... 42

FIGURA 9 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região de coluna vertebral representado em porcentagem de tecido ósseo. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ZOL+OZN e SAL..... 43

FIGURA 10 - Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de mandíbula, nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, f), SAL+OZN (c, g), ZOL+ OZN (d, h) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. No período de 30 dias (a, c, d, e). No período de 30 dias não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. No período de 60 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN, da mesma forma, foi observado resultado estatisticamente relevante na comparação do grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 40x. Escala aplicada 100µm. 44

FIGURA 11 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região mandibular representado em porcentagem de tecido ósseo, os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. No período de 30 dias não se observou diferença entre os grupos SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN. No período de 60 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (α), da mesma forma, foi observado resultado estatisticamente relevante na comparação do grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN (π) 45

FIGURA 12 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área de cabeça femoral buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número acentuado de osteócitos no grupo SAL+OZN (d) quando comparado aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN (a, b, c) no período de 30 dias (a, b, c, d). Já no período de 60 dias os grupos SAL+OZN e ZOL+OZN (h,i) possuem comportamento similar. Nos grupos SAL (f) e ZOL (g), o número de osteócitos foi menor. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25µm..... 47

FIGURA 13 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região de cabeça femoral usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Aos 30 dias, observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos ZOL+OZN e os grupos SAL, ZOL e SAL+OZN. No período de 60 dias notou-se diferença estatística entre os grupos ZOL+OZN e ZOL..... 48

FIGURA 14 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área de coluna vertebral buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a), ZOL (b), SAL+OZN (c) e ZOL+OZN (d) nos períodos de 30 (a, b, c, d) dias. Observou-se número maior de osteócitos nos grupos SAL e SAL+OZN (a, c), os resultados foram aproximados entre os dois grupos ZOL e ZOL+OZN (b, d) que foram menores quando comparado aos grupos anteriores. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25µm..... 49

FIGURA 15 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região de coluna vertebral usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 dias. Os resultados estatísticos não foram significativos para os grupos analisados..... 50

FIGURA 16 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área mandibular buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número acentuado de osteócitos no grupo ZOL+OZN em comparação aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, já para o período de 60 dias os resultados são similares aos 30 dias onde o grupo ZOL+OZN apresentou resultados melhores quando comparado aos demais grupos SAL, ZOL, SAL+OZN. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25µm..... 52

FIGURA 17 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região mandibular usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. No período de 30 dias não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. No período de 60 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN, da mesma forma, foi observado resultado estatisticamente relevante na comparação do grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e

SAL+OZN..... 53

FIGURA 18 - Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de cabeça femoral, presentes nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número reduzido de células inflamatórias nos grupos SAL e ZOL. Já no grupo SAL+OZN e ZOL+OZN observa-se uma quantidade aumentada de células. Com esta característica, os resultados foram semelhantes tanto para o período de 30 quanto de 60 dias. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25µm..... 55

FIGURA 19 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de cabeça femoral usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL, no período de 60 dias. Notou-se diferença estatística entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL..... 56

FIGURA 20 - Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de coluna vertebral, presentes nos grupos SAL (a), ZOL (b), SAL+OZN (c) e ZOL+OZN (d) nos períodos de 30 (a, b, c, d) dias. Observa-se número semelhante de células inflamatórias nos grupos SAL, ZOL e SAL+OZN, porém nos grupos ZOL+OZN nota-se um aumento no número de linfócitos. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25µm..... 57

FIGURA 21 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de coluna vertebral usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 dias. Observou-se resultados sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais..... 58

FIGURA 22 - Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de mandíbula, presentes nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número reduzido de células inflamatórias nos grupos SAL e ZOL. Já no grupo SAL+OZN e ZOL+OZN observa-se uma quantidade aumentada de células. Com esta característica, os resultados foram semelhantes tanto para o período de 30 quanto de 60 dias. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25µm..... 59

FIGURA 23 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de mandíbula usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos SAL+OZN e ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL, no período de 60 dias. No período de 30 dias não foi observado estatisticamente relevante entre os grupos.....	60
FIGURA 24 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais do grupo SAL: cérebro (a, f), fígado (b, g), mesentério (c, h), pulmão (d, i) e rim (e, j), nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 dias (f, g, h, i, j). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25µm.....	62
FIGURA 25 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais do grupo ZOL: cérebro (a, f), fígado (b, g), mesentério (c, h), pulmão (d, i) e rim (e, j), nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 dias (f, g, h, i, j). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25µm.....	64
FIGURA 26 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais do grupo SAL+OZN: cérebro (a, f), fígado (b, g), mesentério (c, h), pulmão (d, i) e rim (e, j), nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 dias (f, g, h, i, j). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25µm.....	65
FIGURA 27 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais do grupo ZOL+OZN: cérebro (a, f), fígado (b, g), mesentério (c, h), pulmão (d, i) e rim (e, j), nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 dias (f, g, h, i, j). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25µm.....	66
FIGURA 28 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais dos grupos SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) da região correspondente ao mesentério no período de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i, j) dias. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25µm.....	67
FIGURA 29 - Gráfico representativo do módulo de elasticidade do teste biomecânico realizado na região de colo femoral referente aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN (\$, £), da mesma forma, foi observado resultados estatisticamente	

significantes na comparação dos grupos ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (&,
*)..... 68

FIGURA 30 - Gráfico representativo da energia de deformação do teste biomecânico realizado na região de colo femoral referente aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significante entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (\$, £)..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância
AZ	Ácido zolêndronico
BV/TV	Porcentagem do volume ósseo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CAR	Caracterização
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
E	Resiliência
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Histologista certificado
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
HE	Hematoxilina e eosina
LM	Limites máximo
LP	Limites de proporcionalidade
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina
OVX	Ovariectomia bilateral
OZN	Ozônio
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
R	Rigidez
RANK-L	Ativador do receptor do fator nuclear-kappa β ligante
S	Sem tratamento
SAL	Solução salina
Tb.N	Número das trabéculas
Tb.SP	Separação das trabéculas ósseas
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
TIIF	Formato de Arquivo de Imagem com Tags
TJNL	Codificação do grupo experimental
VGEF	Fator de crescimento endotelial vascular
ZOL	Zoledronato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
2.1 Ovariectomia bilateral	30
2.2 Protocolo medicamentoso: ácido zoledrônico.....	30
2.3 Protocolo medicamentoso: Ozônio.....	31
2.4 Eutanásia e obtenção das amostras	32
2.5 Caracterização da microarquitetura óssea	32
2.6 Processamento histológico das amostras	35
2.7 Análises	35
2.8.1 Histologia/Histometria.....	35
2.8.1.1 Padrão tecido ósseo	35
2.8.1.2 Porcentagem de tecido ósseo vital.....	36
2.8.1.3 Contagem de células inflamatórias.....	37
2.8.2 Biópsia de órgãos de absorção e metabolismo	37
2.8.3 Análise biomecânica.....	37
2.9 Análise estatística	38
3 RESULTADOS	39
3.1 Análise histológica	39
3.2 Área de Tecido ósseo nas regiões de cabeça femoral, coluna vertebral e mandíbula	39
3.3 Tecido ósseo vital	45
3.4 Contagem de células inflamatórias.....	54
3.5 Biópsia de órgãos de metabolismo	60
3.6 Análise Biomecânica	68
4 DISCUSSÃO.....	70
5 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS.....	80

1 INTRODUÇÃO

O aumento na expectativa de vida da população mundial impulsiona a ciência na busca de novos materiais e métodos para otimizar o metabolismo do organismo em senescência. Agravos são encontrados nessa população, tais como hipertensão arterial sistêmica, diabetes, anemia e desnutrição (BERGSTROM; JONSSON; GUSTAFSON; PETTERSSON *et al.*, 2009; PEDEN, 2005; TOROYAN; PEDEN; IAYCH, 2013). Deste modo, um dos principais tecidos que sofrem com a senilidade e outras doenças é o tecido ósseo, principalmente nas mulheres devido às alterações hormonais (BIVER; FERRARI, 2020; KHOSLA; HOFBAUER, 2017; LIU; LI; MAO; LIU *et al.*, 2019).

O climatério causa uma alteração no *turnover ósseo* e está associada ao desenvolvimento de osteopenia e osteoporose, definida como uma alteração na macro e micro arquitetura óssea, em que se observa um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, em que a atividade osteoclástica é aumentada e a atividade osteoblástica é diminuída (KENDLER; CHINES; CLARK; EBELING *et al.*, 2020; RAMALHO-FERREIRA; FAVERANI; MOMESSO; LUVIZUTO *et al.*, 2017; SÖZEN; ÖZİŞİK; BAŞARAN, 2017; TARANTINO; CEROCCHI; SCIALDONI; SATURNINO *et al.*, 2011; WATTS; DORE; BAIM; MITLAK *et al.*, 2021).

Estas alterações na macro e micro arquitetura levam a fragilidade óssea, podendo elevar a susceptibilidade as fraturas mesmo em traumas de baixa energia. Existe uma associação entre a diminuição da densidade óssea e o aumento da suscetibilidade as fraturas vertebrais e do colo do fêmur, como consequência dessas fraturas a dor, incapacidade e diminuição da qualidade de vida e em muitos casos redução da expectativa de vida é observada (CALIRI; DE FILIPPIS; BAGNATO; BAGNATO, 2007; HU; WANG; SHI; SONG *et al.*, 2020; LEDER; MITLAK; HU; HATTERSLEY *et al.*, 2020; SÖZEN; ÖZİŞİK; BAŞARAN, 2017).

O tratamento medicamentoso para os casos de baixa densidade óssea está associado principalmente à administração de anti-reabsortivos que vão inibir a ação osteoclástica levando a uma estabilização do processo de remodelação óssea. Pacientes com metástase óssea também necessitam em muitos casos de terapia com medicamentos anti-reabsortivos para controlar a evolução da doença (ADAMS; ADAMS; RAEBEL; TANG *et al.*, 2018; COLELLA; CAMPISI; FUSCO, 2009; RUGGIERO, 2011).

Medicamentos anti-reabsortivos tem a capacidade de tratar várias alterações patológicas relacionadas ao "turnover ósseo", como osteopenia, osteoporose e metástases ósseas (DAL

PRÁ; LEMOS; OKAMOTO; SOUBHIA *et al.*, 2017; GOVAERTS; PICCART; OCKERMAN; COROPCIUC *et al.*, 2020). Outras classes de medicamentos com diferentes mecanismos de atuação também são utilizados, tais como o bevacizumab, um anticorpo monoclonal inibidor do fator de crescimento endotelial (VGEF) (RAMÍREZ; LÓPEZ-PINTOR; CASAÑAS; ARRIBA *et al.*, 2015), utilizado no tratamento de metástases ósseas, o denosumabe (Inibidor da proteína RANK-L, o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B, utilizado no tratamento da osteoporose) (KYRGIDIS; TOULIS, 2011), o sunitib (atua na inibição do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o temsirolimus (inibidor específico mTOR - rapamicina). Todas essas medicações atuam no metabolismo ósseo (DAVIS; MARTYN-ST JAMES; SANDERSON; STEVENS *et al.*, 2016; SAITO; STERBENZ; MALAY; ZHONG *et al.*, 2017; SANTOS-SILVA; BELIZÁRIO ROSA; CASTRO JÚNIOR; DIAS *et al.*, 2013).

Observando-se na literatura, o risco para o desenvolvimento de osteonecrose é aumentado de 1,9% a 6,7% quando bifosfonatos ou medicamentos anti angiogênicos são utilizados, para pacientes portadores de osteoporose o risco aumenta para 0,21% a cada 4 anos e até 0,4% quando a administração é intravenosa (BETH-TASDOGAN; MAYER; HUSSEIN; ZOLK, 2017; LIMONES; SÁEZ-ALCAIDE; DÍAZ-PARREÑO; HELM *et al.*, 2020; MARX; CILLO; ULLOA, 2007; RUGGIERO; DODSON; FANTASIA; GOODDAY *et al.*, 2014).

Devido as alterações no metabolismo óssea, diversas terapias foram propostas visando a melhoria da fisiologia do tecido ósseo, o oxigênio hiperbárico, laserterapia e mais recentemente a ozonioterapia (GOVAERTS; PICCART; OCKERMAN; COROPCIUC *et al.*, 2020). O ozônio é uma forma alotrópica do oxigênio, composto altamente instável que se desintegra formando oxigênio. Desde o seu desenvolvimento, o ozônio medicinal tem sido utilizado para várias aplicações clínicas específicas, como por exemplo a atividade microbicida (KAZANCIOGLU; EZIRGANLI; DEMIRTAS, 2014; SIVALINGAM; PANNEERSELVAM; RAJA; GOPI, 2017; SOARES; MORAIS; ARAÚJO; MEYER *et al.*, 2019).

A ozonioterapia com aplicação médica apresenta atividade desinfetante, melhorando o reparo e metabolismo ósseo, atividade antioxidante, modulando as respostas imunológicas, aumento da liberação de fatores de crescimento, melhorando o metabolismo do organismo inteiro (BAYER ALINCA; SAĞLAM; ZENGİN CELİK; HACISALIHOGU *et al.*, 2020; ELVIS; EKTA, 2011; STUBINGER; SADER; FILIPPI, 2006).

O uso do ozônio está associado a aceleração da incorporação de enxertos, em modelo

usando calotas de ratos, o qual se observou que a área de osso neoformada e a quantidade de material residual foi menor nos grupos que fizeram uso do ozônio, existindo a especulação que a hiper oxigenação causada pelo processo de dissociação do ozônio em oxigênio, fez com que esse processo otimize o reparo e possivelmente, o dinamismo do tecido, caracterizado pela remodelação óssea acoplada: taxa de absorção/formação (TOKER H. ÖZDEMİR H.; H., 2016).

Compreendendo o mecanismo de ação dos medicamentos anti-reabsortivos e sua capacidade de estagnar o metabolismo ósseo e supondo que o ozônio apresenta o potencial de otimizar a dinâmica do tecido ósseo, atrelado ao ineditismo desta investigação pelo conhecimento dos autores, os dados obtidos aqui serão importantes para a tomada de decisão clínica no uso desta terapia dentro do espectro médico-odontológico. A hipótese do estudo diante do que foi analisado nos princípios biológicos do ozônio nos tecidos (H1) é que a utilização da terapia com ozônio poderia melhorar o metabolismo ósseo das ratas com baixa densidade óssea que receberam doses osteoporóticas de ácido zoledrônico.

O objetivo do presente estudo pré-clínico é analisar o dinamismo ósseo (mandíbula, coluna vertebral e colo de fêmur) de ratas ovariectomizadas tratadas com ácido zoledrônico sob a influência da aplicação sistêmica do ozônio.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenho do estudo utilizou 110 ratas *rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, fêmeas com 6 meses de idade e com peso corporal compreendido entre 200 – 250 g. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY, 2011). O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e foi aprovado com o número de protocolo 00405-2019(anexo A).

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas com quatro animais, em um ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos.

Para que existisse uma correlação com o perfil epidemiológico da osteoporose no ser humano foram usadas ratas ovariectomizadas (OVX) durante todo o estudo. Para tanto, foi necessária a caracterização da arquitetura óssea para comprovar a efetividade da ovariectomia e a diminuição da densidade óssea dos animais, a caracterização (CAR) foi feita por meio de Micro ct da região da cabeça do fêmur em dois momentos específicos.

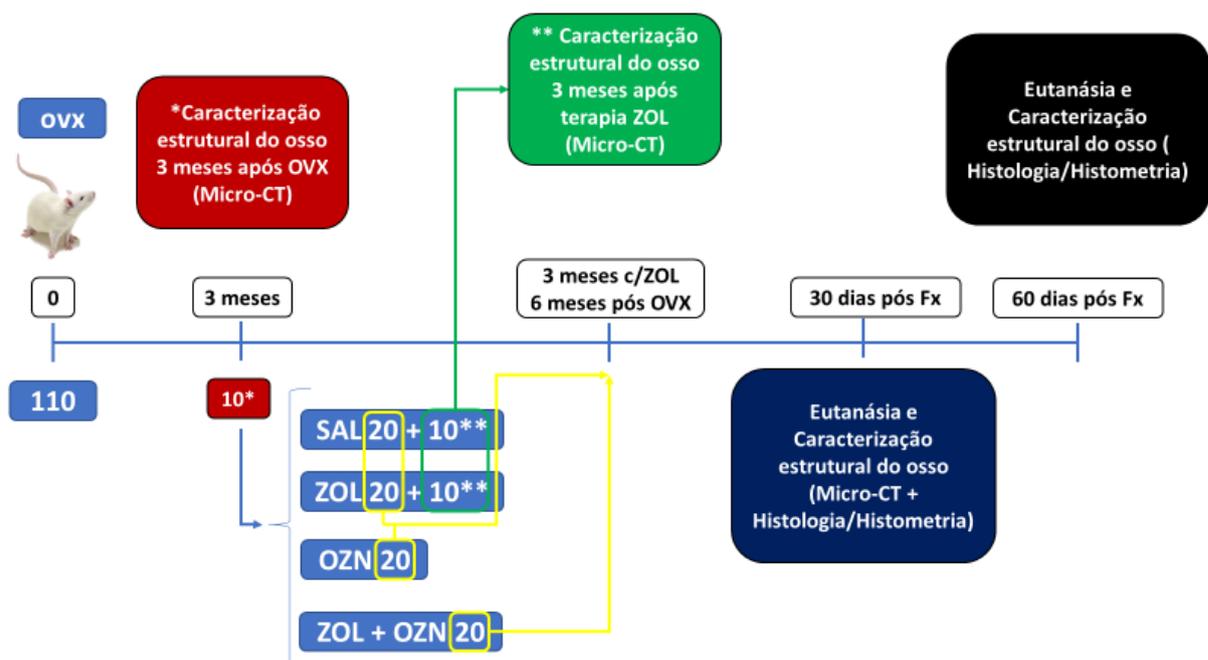
Após a cirurgia de ovariectomia foi necessário um período de três meses para indução da diminuição da densidade óssea (CHEN; WANG; SERDAR TULU; ARIOKA *et al.*, 2018; CHEN; YANG; YAO; CUI *et al.*, 2016; WRONSKI; WALSH; IGNASZEWSKI, 1986), em seguida de forma aleatória foram selecionados dez animais para a primeira caracterização óssea (grupo caracterização CAR). A seleção dos animais foi realizada por meio de sorteio com o auxílio de envelope, todos os animais receberam brincos de 1 a 110, os números correspondentes foram colocados em um envelope e dez animais foram selecionados para a primeira caracterização, os animais foram submetidos a eutanásia para comprovação da eficácia do procedimento de ovariectomia.

Logo após a primeira caracterização, foi realizada à randomização dos animais em dois grupos. A randomização foi feita por meio de envelopes contendo 2 papéis, um com a letra Z (zoledronato) e outro com a letra S (sem tratamento), cada animal foi retirado de sua gaiola e um sorteio realizado, o animal foi designado para o grupo corresponde ao papel sorteado, o

processo foi realizado até que todos os animais fossem divididos nos dois grupos. A randomização iniciou-se a administração de ácido zoledrônico (n=50) nos animais do grupo zol, os demais animais (n=50) foram submetidos a aplicações de solução salina para que os stress fosse o mesmo em ambos os grupos, os animais foram mantidos em acompanhamento sem tratamento para a diminuição da densidade óssea, durante um período de três meses.

Após três meses, dez animais dos grupos ácido zoledrônico e dez animais do grupo sem tratamento foram selecionados de forma aleatório por meio de um envelope com os números dos brincos dos animais pertencentes a cada grupo, para uma segunda caracterização por meio do Micro ct.

FIGURA 1 - Esquema representativo da linha do tempo do estudo, observa-se período de caracterização, divisão dos grupos e períodos de eutanásia



Fonte: Autor, 2021

Finalizando o processo de caracterização, um total de 80 animais restantes foram divididos nos seguintes grupos: os animais tratados com ácido zoledrônico foram divididos de forma aleatória por meio de envelope e número de brincos nos grupos ácido zoledrônico (ZOL) (n=20) e ácido zoledrônico + ozônio (ZOL+OZN) (n=20) e os animais que pertencem ao grupo sem tratamento foram subdivididos em dois grupos solução salina (SAL) (n=20) e solução + ácido zoledrônico (SAL+OZN) (n=20).

2.1 Ovariectomia bilateral

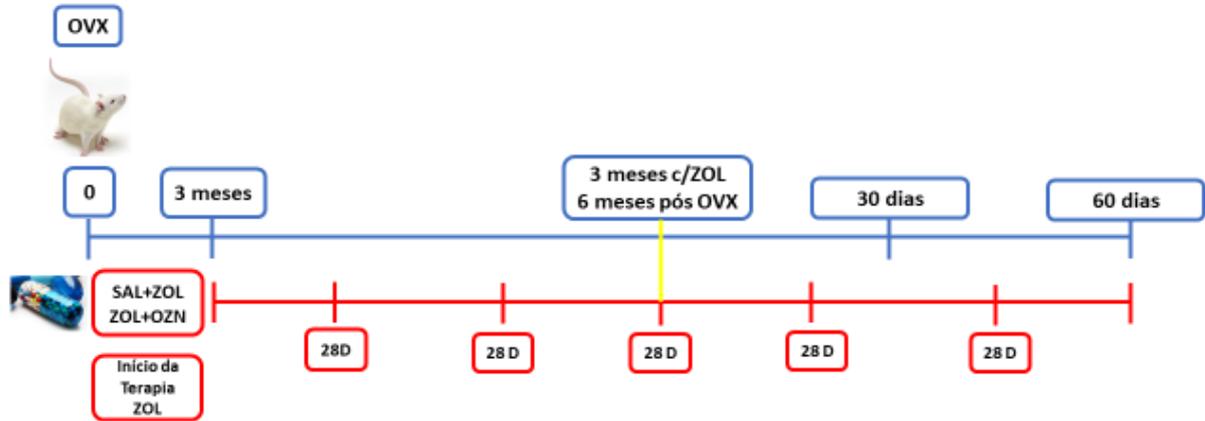
As ratas foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) 5mg/kg e Cloridrato de quetamina 50mg/kg (Ketamina, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) por via intramuscular e a seguir feitas incisões nas regiões de flanco direito e esquerdo, em seguida divulsão por planos e acesso aos ovários que foram removidos.

2.2 Protocolo medicamentoso: ácido zoledrônico

O tratamento com ácido zoledrônico (AZ) para tratar a osteoporose em humanos geralmente é estabelecido por meio da administração endovenosa de 5 mg da medicação em dose única anualmente (HAO; WANG; WANG; LU *et al.*, 2015; KHAJURIA; VASIREDDI; TREBBIN; KARASIK *et al.*, 2017). Esta dosagem corresponde a 10% daquela utilizada no protocolo medicamentoso oncológico com a mesma medicação. Deste modo, os mesmo parâmetros usados para adequação de dose, avaliando tempo de vida médio do animal, o peso e a superfície corporal da espécie utilizada, neste caso foram ratas *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, a dose estabelecida foi de 100µg/Kg a cada 28 dias, em que esta posologia é semelhante aos estudos previamente publicados (OLEJNIK; FALGAYRAC; DURING; CORTET *et al.*, 2016; SHIRAKI; TANAKA; SUZUKI; UEDA *et al.*, 2017; TURKER; ASLAN; CIRPAR; KOCHAI *et al.*, 2016; YANG; PAN; YU; CHEN *et al.*, 2015).

O plano de tratamento medicamentoso teve duração de cinco meses e a administração de veículo ou ácido zoledrônico (Sigma Chemical®, St Louis, MO, EUA) para os grupos (ZOL, ZOL+OZN) ocorreu pela via intraperitoneal, obedecendo um intervalo de vinte e oito dias (28 dias) entre as injeções.

FIGURA 2 - Esquema representativo do início e os intervalos de aplicação do ácido zoledrônico nos animais participantes dos grupos ZOL e ZOL+ OZN



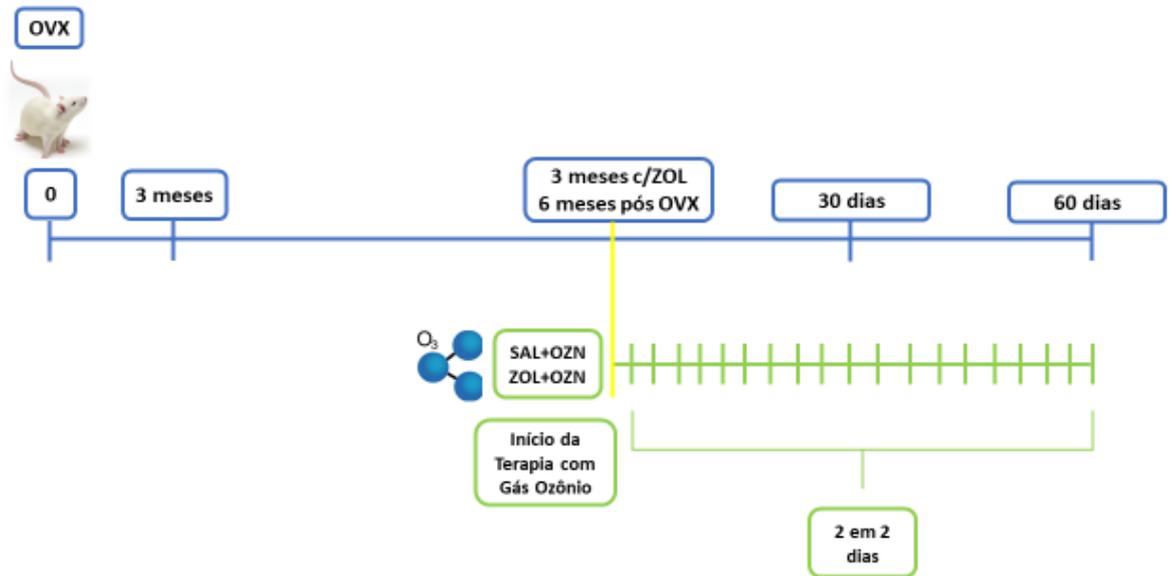
Fonte: Autor, 2021

2.3 Protocolo medicamentoso: Ozônio

A aplicação da medicação do ozônio foi baseada em estudos prévios, em que a literatura mostra que o ozônio em uma concentração de 0,7mg/kg apresenta bons resultado na reparação de defeitos de calota associado a biomateriais ou não, no reparo alveolar e no tratamento da doença periodontal (KAN; SENCIMEN; BAYAR; KORKUSUZ *et al.*, 2015; KOCA; YURTTAS; BILGIC; CAYCI *et al.*, 2010; SAGLAM; ALINCA; CELIK; HACISALIHOGU *et al.*, 2020).

Este protocolo foi aplicado nos grupos SAL+OZN (n=20) e ZOL +OZN (n=20). Para a aplicação da ozonioterapia, foi utilizado o aparelho fornecido pela empresa OZONE&LIFE INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SISTEMAS LTDA (São José dos Campos – SP), sendo realizado aplicação do gás ozônio via intraperitoneal em uma seringa descartável de 30 ml com agulha de calibre 25mm x 0,07mm, as aplicações foram feitas de 2 em 2 dias até o final do experimento.

FIGURA 3 - Esquema representativo do início e os intervalos de aplicação do ozônio nos animais participantes dos grupos SAL+OZN e ZOL+ OZN



Fonte: Autor, 2021

2.4 Eutanásia e obtenção das amostras

Os animais foram anestesiados, nas mesmas doses e utilizando os mesmos anestésicos descritos anteriormente e, procedeu a perfusão transcardíaca com solução salina fisiológica acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml), constituída de 4% de formaldeído (Sigma Chemical®, Saint Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino (PBS - Sigma Chemical®), 0,1M, 4°C, pH 7,4.

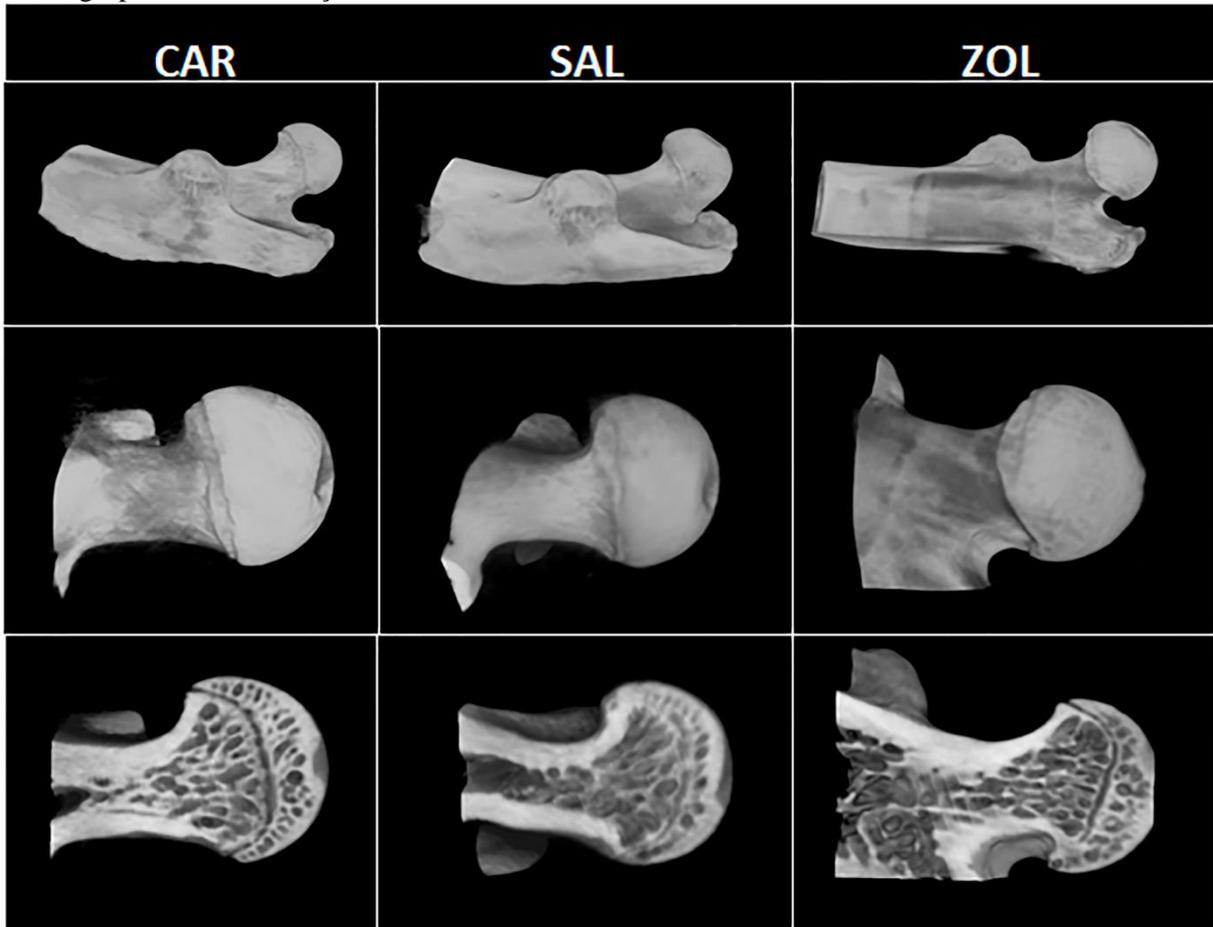
2.5 Caracterização da microarquitetura óssea

A análise foi realizada usando a microtomografia computadorizada (Micro ct) SkyScan 1176 Bruker Micro CT, Aatselaar, Bélgica, 2003), em que foram obtidos os parâmetros referentes à quantidade do tecido ósseo (BV/TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas e Tb.N= número das trabéculas, Po. Tot= porosidade total) (BOUXSEIN; BOYD; CHRISTIANSEN; GULDBERG *et al.*, 2010).

Essas comparações da microarquitetura óssea da região de cabeça femoral, desde o momento da realização da cirurgia de ovariectomia, bem como após as terapias ZOL e SAL, os parâmetros microtomográficos BV.TV e Tb.Th mostraram os maiores dados para o grupo CAR

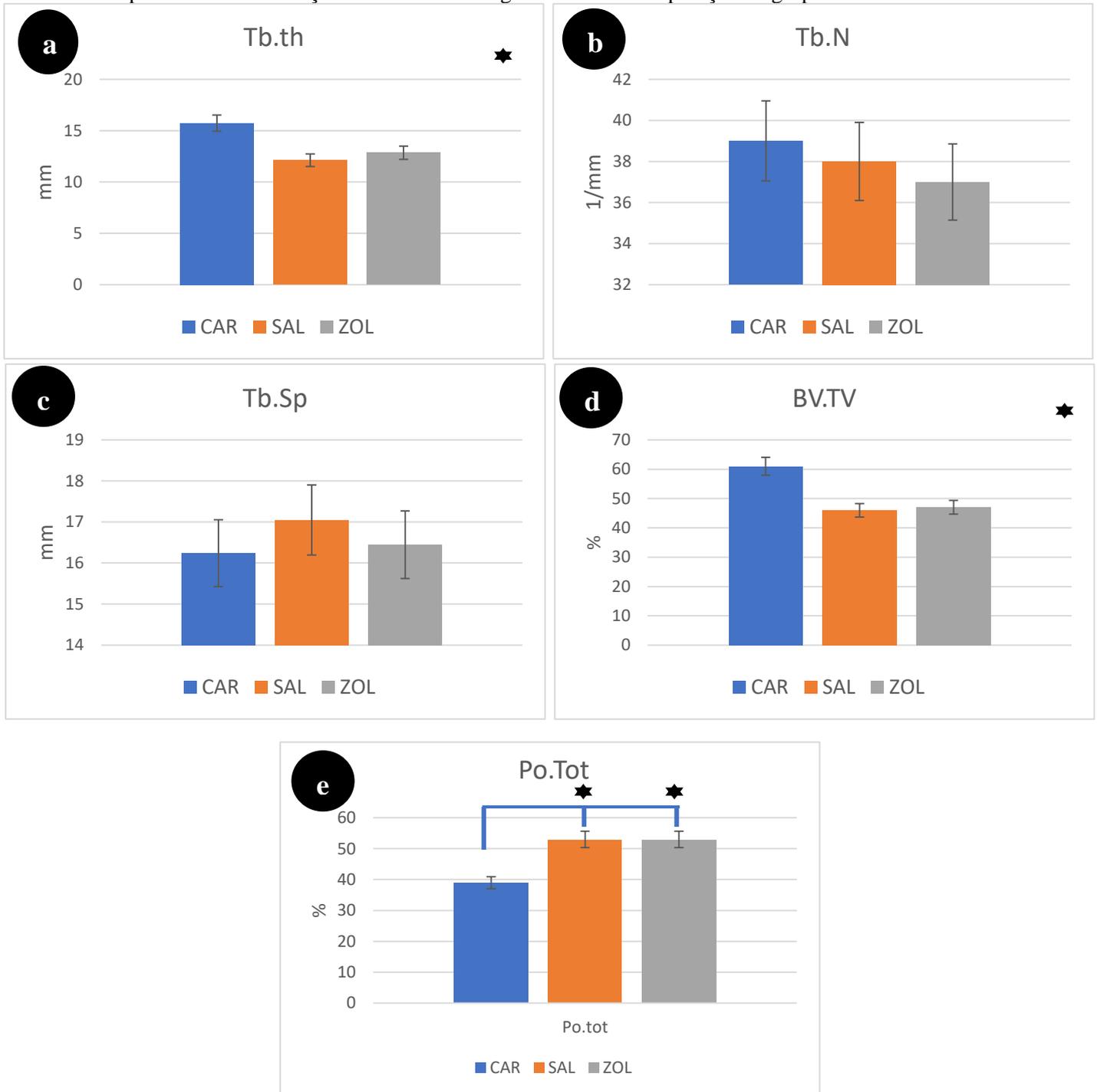
em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Portanto, $CAR > SAL = ZOL$. Para Tb.N e Tb.Sp, as comparações mostraram dados sem diferenças significativas ($p > 0,05$). O parâmetro Po.Tot mostrou menor valor para o grupo CAR em relação aos outros grupos ($p < 0,05$), assim, $CAR < SAL = ZOL$ (Figuras 4 e 5).

FIGURA 4 - Figura representativa da reconstrução microtomográfica dos grupos CAR, SAL e ZOL, observa-se uma diminuição das trabéculas e aumento das corticais no osso da região de cabeça femoral dos grupos ZOL em relação ao CAR e SAL.



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 5 - Representação gráfica da microtomografia da região de cabeça femoral dos animais da caracterização, observa-se diferenças estatisticamente significativa entre o grupo CAR e os grupos SAL e ZOL nos parâmetros (BV.TV/Tb.Th) (a, d)), no parâmetro Po.Tot (e) os grupos SAL e ZOL apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo CAR.



Fonte: Autor, 2021

2.7 Processamento histológico das amostras

As peças coletadas das regiões de mandíbula, coluna vertebral e fêmur dos animais dos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN passaram pelo processamento histológico padrão com fixação (formaldeído 4%), lavagem em água corrente e desmineralizadas em solução constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma Chemical®), durante 60 dias.

Após a descalcificação, a região correspondente ao alvéolo mandibular do primeiro molar e colo do fêmur foram separadas. Assim, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção das lâminas. Foram coletados, de lingual para vestibular, as secções histológicas da porção do alvéolo dental e tecidos adjacentes a serem analisados, em número de três secções histológicas, em duplicata, situadas na porção vestibular, média e lingual do alvéolo dental para se efetuar a análise histológica. As imagens foram capturadas via utilização de câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. Todas as análises foram realizadas por um histologista certificado (EE), previamente calibrado e cego aos tratamentos. As secções pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

2.8 Análises

2.8.1 Histologia/Histometria

2.8.1.1 Padrão do tecido ósseo

As fotomicrografias das lâminas histológicas foram obtidas a partir de uma câmera fotográfica (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) acoplada em um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland). As imagens foram salvas em TIFF e transferidas para o programa computacional ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). As análises foram realizadas por um observador calibrado por duas vezes em períodos diferentes com pelo menos 7 dias de intervalo entre uma análise e outra. Após cada análise, o teste estatístico kappa foi aplicado para verificar o erro intra-examinador. Somente

com valores de $k > 0,8$ os dados foram tabulados para a análise estatística.

Para a análise histológica/histométrica do padrão de tecido ósseo na região do colo do fêmur, coluna vertebral e mandíbula, uma fotomicrografia foi realizada em cada região desses ossos analisados em microscópio óptico, como previamente descrito, utilizando a objetiva de 6,3x. A avaliação histológica envolveu a descrição das características do tecido ósseo cortical e medular, dos diferentes grupos experimentais (SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN), observando se as terapias aplicadas exerceram influência no dinamismo do osso das regiões analisadas, nos períodos de 30 e 60 dias após os procedimentos de ovariectomia (30 e 60 dias para colo femoral e somente 30 dias para coluna vertebral).

Visando a padronização da região de análise no tocante a coluna vertebral, o estudo de (CHEN; ZHOU; EMURA; SHOUMURA, 2009) padronizou a vertebra L4 como sendo a região mais propícia para esta análise. Para as mandíbulas foi padronizado a região de septo interradicular do primeiro molar como área de interesse para análise.

Já para a análise quantitativa (histometria), no programa Image J, antes do início da histometria, a calibração foi realizada por meio de uma régua calibradora fotomicrografada na mesma objetiva da análise de interesse, nesta primeira, de 6,3x. Utilizando a ferramenta "straight" delimitou-se a distância entre duas marcações das régua que equidistam a 100 μm , o que foi calibrado nas configurações do programa ("set scale"). A partir deste momento, as fotos das lâminas foram abertas e utilizando a ferramenta "free hands", um pesquisador que não conhecia a codificação do grupo experimental (TJLN), mensurou a quantidade de osso na região do tecido ósseo do colo femoral e na coluna vertebral. Em seguida, com a ferramenta "rectangle", toda a extensão da foto, correspondente a lâmina fotografada, foi calculada a área total. Assim, o valor da porcentagem de área de tecido ósseo nas regiões de interesse em relação à área total foi calculado.

2.8.1.2 Porcentagem de tecido ósseo vital

Para o cálculo da porcentagem de tecido ósseo vital, as mesmas lâminas foram fotomicrografadas com a objetiva de 100x e auxílio de óleo de imersão, padronizando sempre a região mais central da cabeça femoral, da coluna vertebral e da mandíbula selecionada e a região do septo interradicular do primeiro molar inferior. Após as imagens serem salvas em formato TIFF no programa Image J, por meio da ferramenta "grid", 130 pontos ficaram

estabelecido para todos os grupos e, a quantidade de osteócitos foi mensurada para cada tempo e grupos experimentais. Em seguida, com a ferramenta "rectangle", toda a extensão da foto, correspondente a lâmina fotografada, foi calculada a área total. Assim, o valor da porcentagem de osso vital em relação à área total foi calculado.

2.8.1.3 Contagem de células inflamatórias

Todas as etapas metodológicas mencionadas no item anterior (1.8.1.2) foram realizadas também neste item para a contagem das células inflamatórias, com ênfase em linfócitos. A contagem de células inflamatórias tem por objetivo analisar se as terapias aplicadas influenciam o dinamismo do osso nas regiões analisadas para os diferentes grupos experimentais (SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN), nos períodos de 30 e 60 dias após os procedimentos de ovariectomia (30 e 60 dias para colo femoral e mandíbula e somente 30 dias para coluna vertebral).

2.8.2 Biópsia de órgãos de absorção e metabolismo

Órgãos de absorção e de metabolismo foram coletados para a análise histopatológica. Assim, mesentério, pulmões, o fígado, rim e cérebro serão coletados e imediatamente fixados em formalina 10% tamponada. As peças foram micromotomizadas e coradas em hematoxilina e eosina (HE). A análise histopatológica foi realizada em microscopia óptica e possíveis alterações nos órgãos, tais como presença de infiltrado celular, tecidos hiperplásicos, transformações metaplásicas ou displásicas, foram analisadas entre os grupos experimentais (LEGEROS; CRAIG, 1993).

2.8.3 Análise biomecânica

Os colos dos fêmures foram removidos para o ensaio biomecânico. Os ossos foram retirados e dissecados, identificados por grupo experimental, em seguida foram envolvidos por gazes embebidas em solução fisiológica e congelados em freezer à temperatura de -20°C, até o momento do ensaio.

Os ensaios mecânicos de flexão sobre o colo de fêmur foram realizados sobre a região que envolvem as estruturas anatômicas trocanter, colo e cabeça femoral. Estas estruturas foram

fixadas em uma base feita de resina acrílica para padronização, os ensaios foram realizados no Laboratório de ensaios mecânicos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/Unesp), na máquina de ensaio DL 3000 (EMIC, São José dos Pinhais/PR, Brasil). No ensaio de compressão sobre o colo de fêmur, as bases feitas de resina acrílica foram fixadas em uma base para estabilização. Uma célula de carga KRATOS® modelo KM, com capacidade de até 200 kgf foram utilizadas e ligadas a uma ponte de extensometria SODMEX®, modelo CAE201. As deflexões foram registradas por um relógio comparador Mitutoyo® com precisão de centésimos de milímetros. Uma pré-carga de 0,5 kgf foi utilizada para acomodação do sistema: máquina, acessórios e osso, com um tempo de acomodação de 1 minuto. A velocidade de aplicação da carga foi de 0,50 mm/min.

Em face dos resultados coletados, o sistema forneceu os gráficos de carga versus deflexão para cada osso submetido ao ensaio mecânico, e a partir das curvas, as propriedades mecânicas para cada situação foram obtidas: limites de proporcionalidade (LP), limites máximos (LM), rigidez (R) e resiliência (E). O LP é identificado como sendo o último ponto onde se encontra o segmento reto da curva carga x deflexão; LM são os maiores valores da carga e deflexão observados em cada ensaio (ponto máximo).

Foram confeccionados gráficos onde o deslocamento e a deformação foram representados, usando estes gráficos foram analisados os módulos de elasticidade e a energia de deformação. O módulo de elasticidade foi obtido a partir da inclinação da curva deslocamento deformação, já a energia absorvida pelo corpo foi calculada através da área sob a curva força deformação.

2.9 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa Sigmaplot 12.0 (Exakt Graphs and data analysis, San Jose, CA, USA). Todos os valores obtidos das análises quantitativas foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para o parâmetro de porcentagem de tecido ósseo na região de cabeça femoral e mandíbula, o teste ANOVA-2 fatores (grupos vs períodos de análise) foi aplicado e em seguida o pós-teste Tukey. Para o mesmo parâmetro para a coluna vertebral, o teste ANOVA-1 fator (grupos experimentais somente no período de 30 dias) foi aplicado e pós-teste de Tukey. Em todos os testes foi considerado $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Análise histológica

As fotomicrografias dos grupos experimentais, representados pela região do colo femoral, coluna vertebral e mandíbula mostraram que independentemente do período analisado (30 ou 60 dias), a proporção de tecido ósseo cortical e do trabeculado ósseo apresentou um aparente desequilíbrio com maior volume de trabeculado em detrimento da cortical óssea. Nas regiões mais críticas, representadas pela medular, as trabéculas eram finas, com considerável espaçamento entre elas. A administração do ZOL claramente promoveu maior quantidade de tecido ósseo cortical em detrimento do osso trabecular, com maior espessura das trabéculas e menor distanciamento das mesmas, mais evidente nas lâminas do período de 30 dias. Aos 60 dias, havia maior área de osso em comparação com o grupo SAL, porém menos que aos 30 dias. Já em relação ao grupo SAL+OZN, independentemente do período analisado, as lâminas não mostraram efeitos adicionais em comparação com o grupo SAL. O grupo ZOL+OZN mostrou de forma clara a grande área de osso, em ambos os períodos, com trabéculas espessas e pouco espaçadas, até maiores aparentemente ao grupo ZOL (Figura 6)

3.2 Área de Tecido ósseo nas regiões de cabeça femoral, coluna vertebral e mandíbula

A porcentagem de osso na região da cabeça femoral no período de 30 dias foi maior nos grupos ZOL+OZN ($76,1 \pm 20,10$) e ZOL ($56 \pm 13,07$), seguida dos grupos SAL+OZN ($20,46 \pm 7,35$) e SAL ($18,27 \pm 10,47$) ($p < 0,05$), em que tanto nas interações ZOL versus ZOL+OZN, quanto SAL versus SAL+OZN, os valores não diferiram em relação aos parâmetros estatísticos ($p > 0,05$). Portanto, a representação das interações estatísticas pode ser representada como na sequência a seguir: **SAL=SAL+OZN<ZOL=ZOL+ZOL+OZN**. Aos 60 dias, o mesmo comportamento foi observado, porém os grupos ZOL+OZN ($52,98 \pm 14,34$) e ZOL ($36 \pm 5,85$) mostraram os maiores valores de porcentagem de área, não diferindo entre eles ($p > 0,05$), e os demais grupos apresentaram os menores valores, SAL+OZN ($25,56 \pm 16,85$) e SAL ($17,64 \pm 7,82$) ($p < 0,05$). Assim, **SAL=SAL+OZN<ZOL=ZOL+ZOL+OZN**. Na comparação intragrupo, nenhum grupo apresentou alteração nos valores entre os períodos de 30 e 60 dias ($p > 0,05$) (Figura 7).

FIGURA 6 - Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de cabeça femoral, nos grupos SAL (a, e), ZOL (b, f), SAL+OZN (c, g), ZOL+ OZN (d, h) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (e, f, g, h) dias. No período de 30 dias (a, b, c, d), o grupo ZOL+OZN apresentou maior área de tecido ósseo em comparação com SAL (a), ZOL (b) e SAL+OZN (c). Já o grupo ZOL (b) apresentou resultados mais significativos em comparação ao grupo SAL (a) e SAL+OZN (c). No período de 60 dias, o grupo ZOL+OZN (h) apresentou resultado promissor em comparação ao grupo SAL (e) e SAL+OZN (g). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 40x. Escala aplicada 100µm.

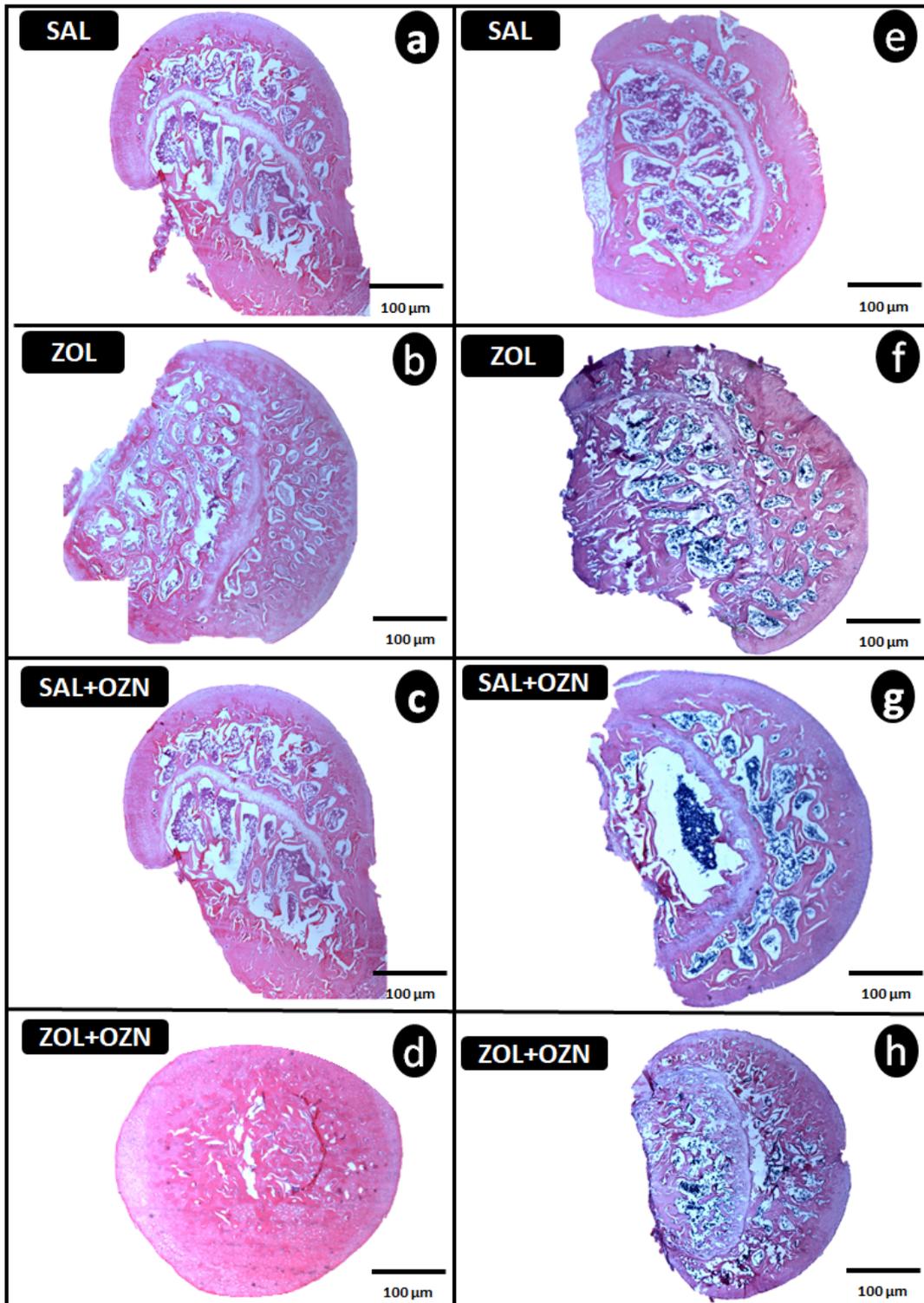
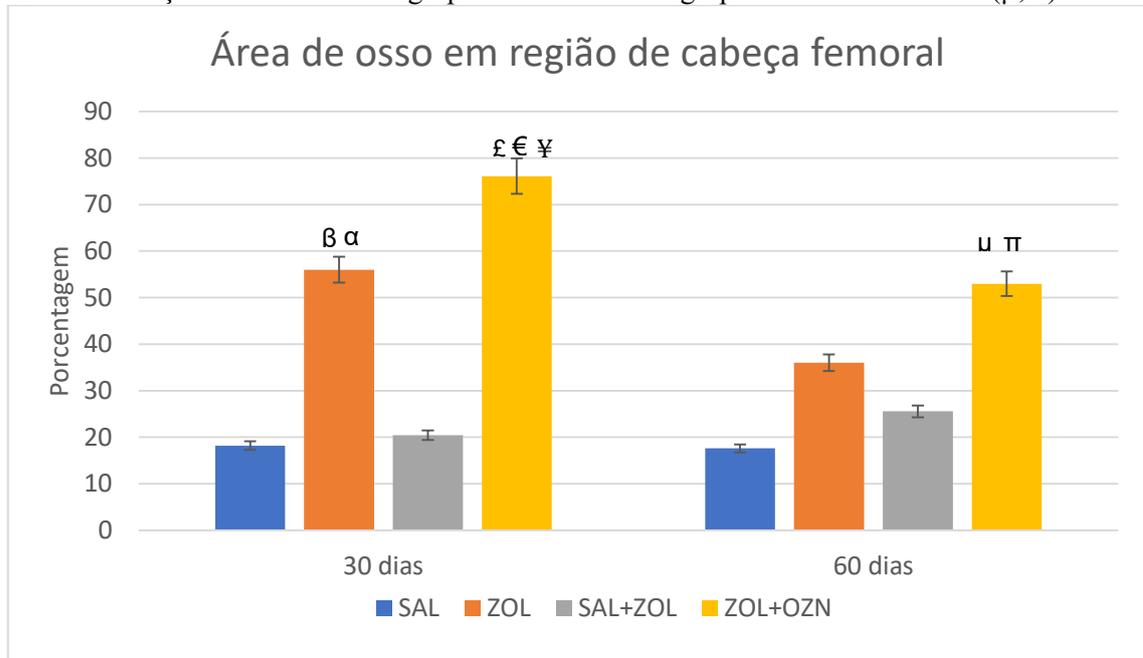


Figura 7 – Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região de cabeça femoral representado em porcentagem de tecido ósseo. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observa-se no período de 30 dias diferença estatisticamente significativo entre os grupos ZOL+OZN e os grupos SAL, ZOL e SAL+OZN (€, £, ¥), o grupo ZOL apresentou diferença estatisticamente relevante quando comparado ao grupo SAL e SAL+OZN (α , β). No período de 60 dias notou-se diferença estatística entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (μ , π)

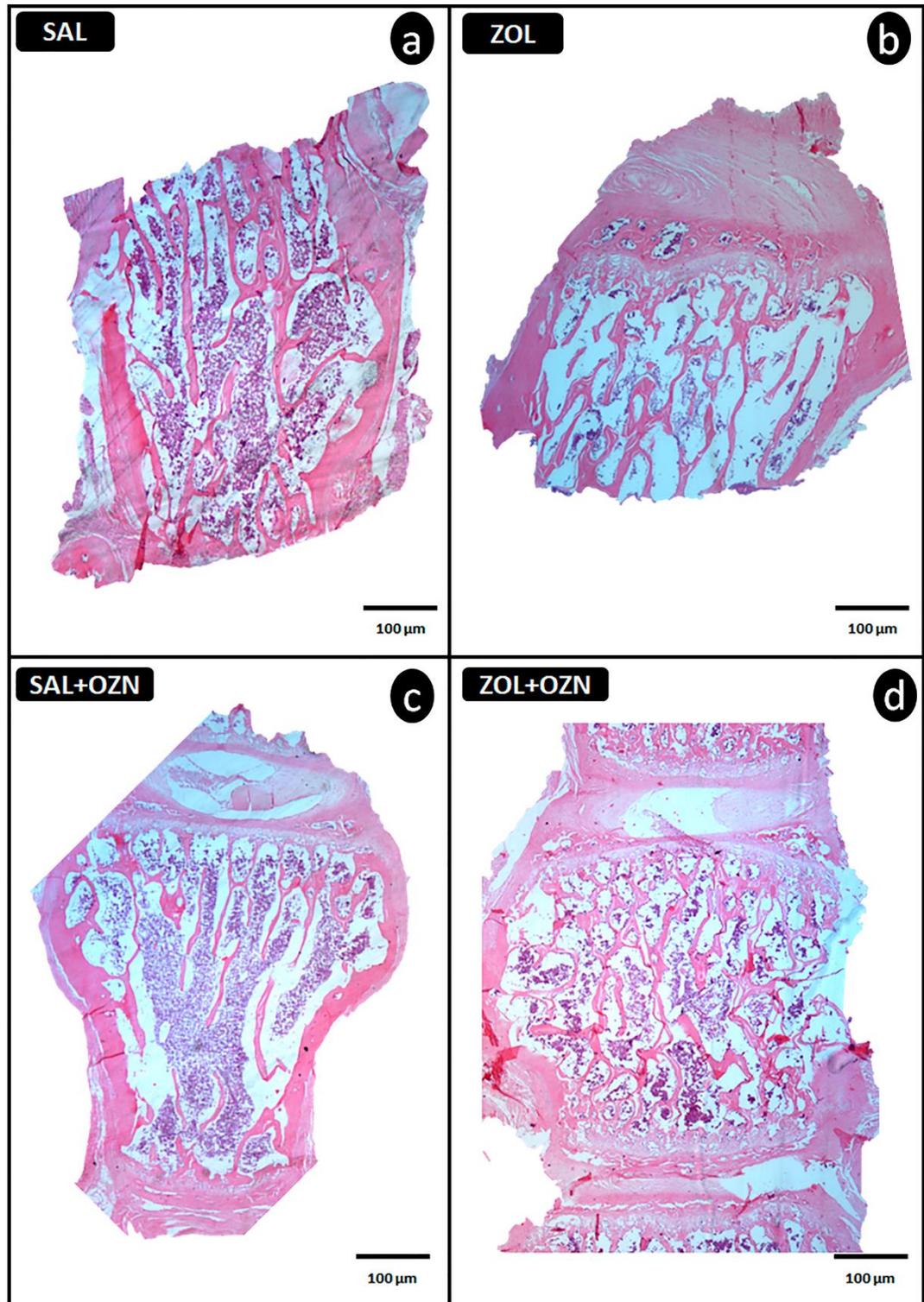


Fonte: Autor, 2021

Na análise histométrica da coluna vertebral aos 30 dias, a menor porcentagem de tecido ósseo foi observada no grupo SAL ($12,73 \pm 5,44$) diferindo dos demais grupos que apresentaram os maiores valores de tecido ósseo [SAL+OZN ($27,81 \pm 18,50$), (ZOL ($42,86 \pm 7,36$), e ZOL+OZN ($59,22 \pm 8,48$)] ($p < 0,05$). Portanto, $SAL < ZOL = SAL+OZN = ZOL+OZN$.

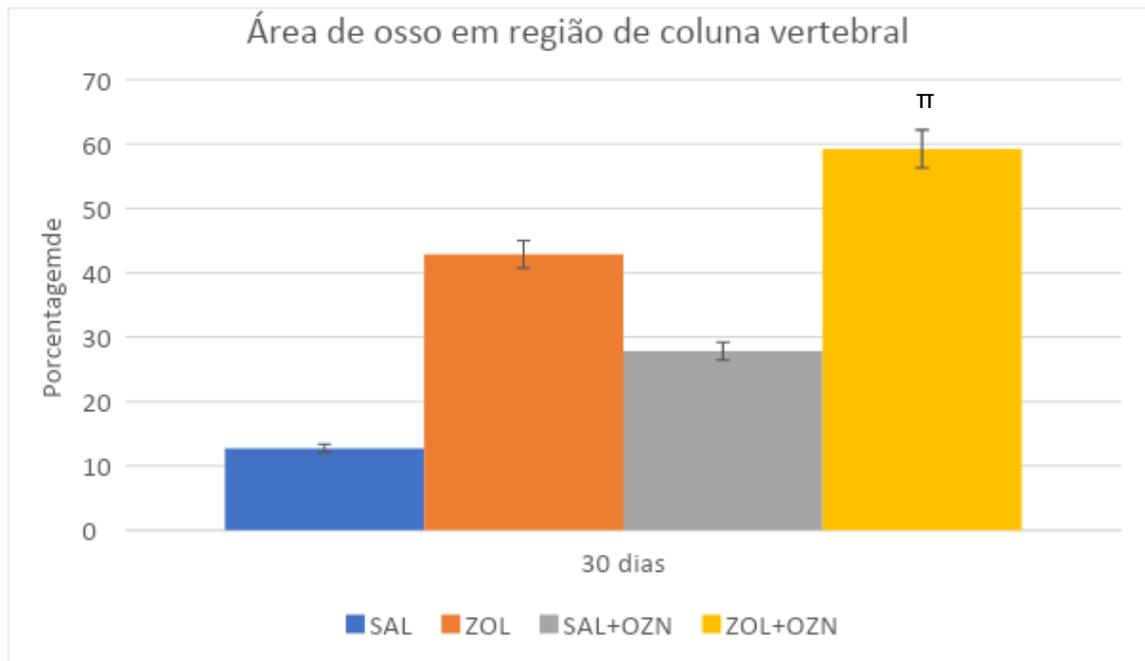
Para a região de coluna vertebral, que foi analisada somente aos 30 dias, na histologia intergrupos, as diferenças na microarquitetura óssea foram menos evidentes quando da aplicação do ZOL em comparação ao grupo SAL e na aplicação do OZN no grupo SAL+OZN. A maior diferença foi encontrada no grupo ZOL+OZN, em que foi notada maior quantidade de tecido ósseo na região do canal medular em comparação aos demais grupos. (Figuras 8 e 9).

FIGURA 8 - Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de coluna vertebral, nos grupos SAL (a), ZOL (b), SAL+OZN (c), ZOL+ OZN (d) nos períodos de 30 (a, b, c, d). Observou-se maior área de tecido ósseo no grupo ZOL+OZN (d) em comparação ao grupo SAL (a). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 40x. Escala aplicada 100 μ m.



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 9 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região de coluna vertebral representado em porcentagem de tecido ósseo. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ZOL+OZN e SAL.



Fonte: Autor, 2021

A porcentagem de tecido ósseo presente na região mandibular no período de 30 dias foi estatisticamente semelhante entre os grupos SAL ($29,16 \pm 10,13$), ZOL ($30,61 \pm 1,58$), SAL+OZN ($26,19 \pm 1,92$), ZOL+OZN ($31,15 \pm 2,60$) ($p > 0,05$), os resultados podem ser representados da seguinte maneira (**SAL=ZOL=SAL+OZN=ZOL+OZN**). Aos 60 dias, observa-se resultados estatisticamente significantes entre os grupos ZOL+OZN ($39,10 \pm 4,82$) e os grupos SAL ($23,81 \pm 3,91$) e SAL+OZN ($28,02 \pm 4,82$) ($p < 0,05$), já o grupo ZOL ($36,64 \pm 4,65$) apresentou resultados estatisticamente significantes quando comparado aos grupos SAL ($23,81 \pm 3,91$) e SAL+OZN ($28,02 \pm 0,83$) ($p < 0,05$), os resultados podem ser representados da seguinte forma (**ZOL=ZOL+OZN > SAL=SAL+OZN**).

Para análise da região mandibular dos animais, a área escolhida foi a região de septo interradicular do primeiro molar nos períodos de 30 e 60 dias. Para o período de 30 dias não foi observada diferença estaticamente significativa entre os grupos (SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN) podendo ser representado da seguinte forma (**SAL=ZOL=SAL+OZN=ZOL+OZN**). Já para o período de 60 dias observou-se resultado estatisticamente significativo entre os grupos ZOL ($36,64 \pm 4,06$) e ZOL+OZN ($39,10 \pm 0,5$) e os grupos SAL ($23,84 \pm 3,64$) e o grupo SAL+OZN ($28,02 \pm 4,4$), os resultados podem ser representados da seguinte forma (**ZOL=ZOL+OZN > SAL=SAL+OZN**) ($p > 0,05$, Teste Anova 2 fatores) (Figuras 10 e 11).

FIGURA 10 - Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de mandíbula, nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, f), SAL+OZN (c, g), ZOL+ OZN (d, h) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. No período de 30 dias não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. No período de 60 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN, da mesma forma, foi observado resultado estatisticamente relevante na comparação do grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 40x. Escala aplicada 100 μ m.

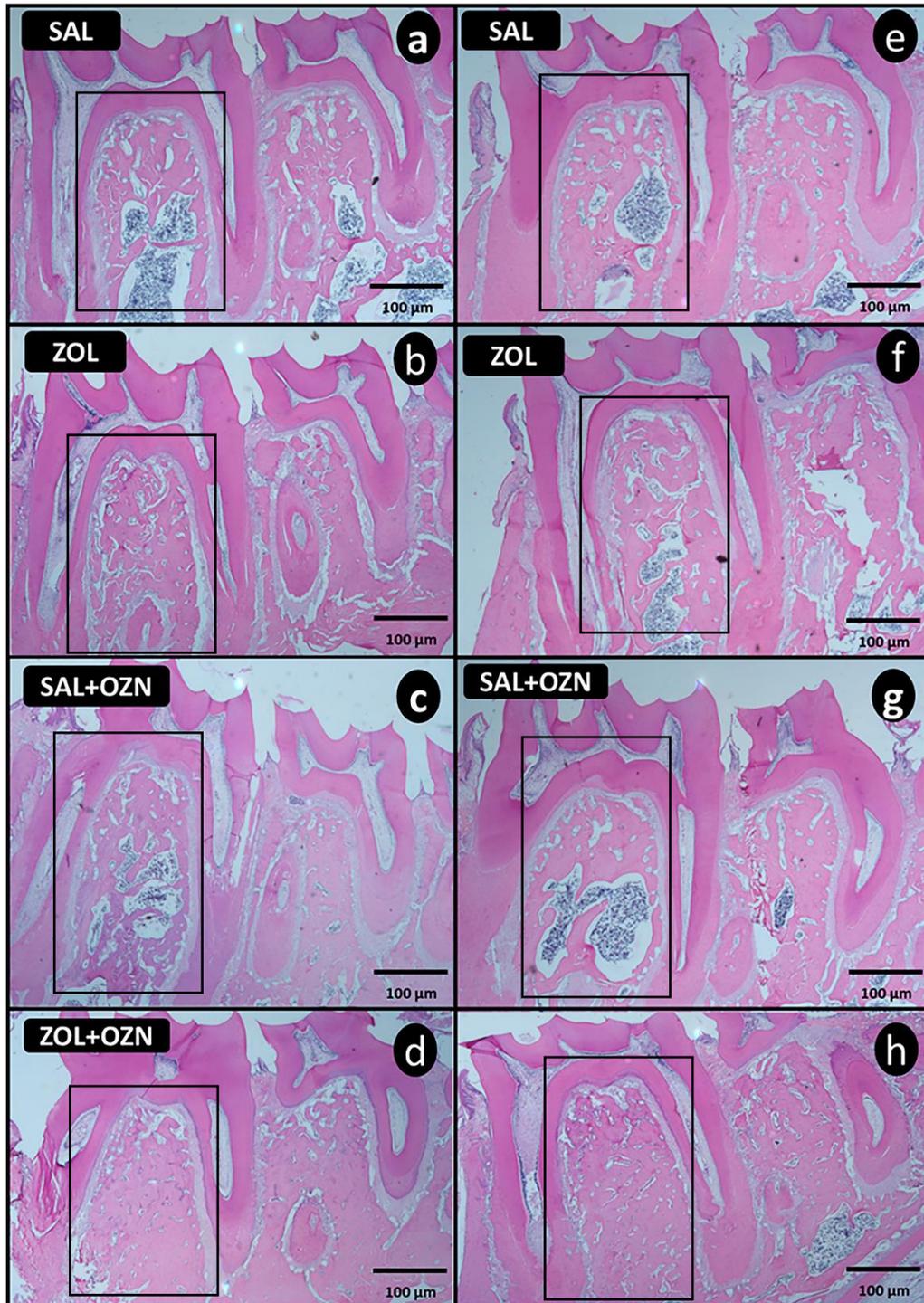
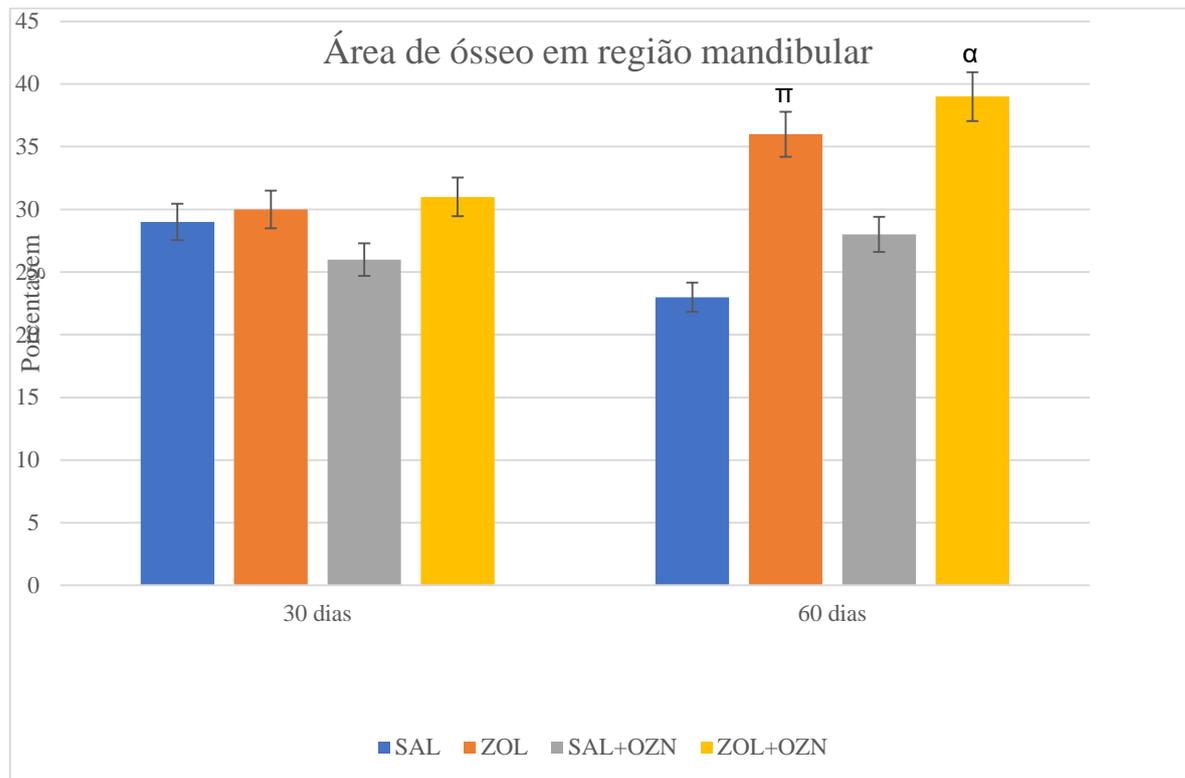


Figura 11 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região mandibular representado em porcentagem de tecido ósseo, os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. No período de 30 dias não se observou diferença entre os grupos SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN. No período de 60 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (α), da mesma forma, foi observado resultado estatisticamente relevante na comparação do grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN (π)



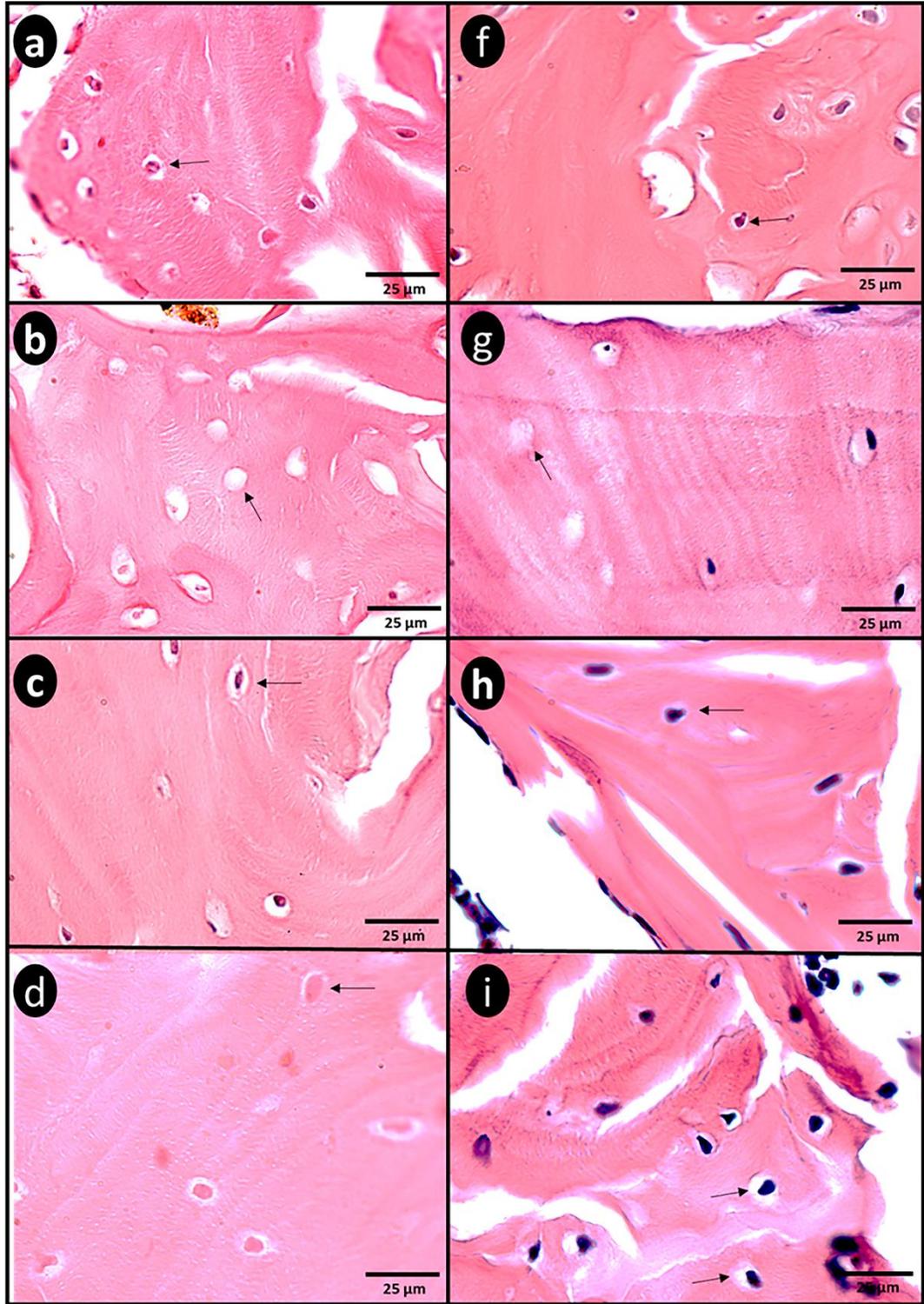
Fonte: Autor, 2021

3.3 Tecido ósseo vital

A imagem representativa dos grupos experimentais evidenciando a magnitude de tecido ósseo vital na região de cabeça femoral nos períodos de 30 e 60 dias pode ser visualizada na figura. Algumas regiões, com especialidade o grupo ZOL, tiveram a matriz extracelular sem osteócitos, apresentando osteoplastos vazios, o que mostrou desvitalidade do tecido ósseo. O grupo ZOL+OZN foi capaz de apresentar regiões da matriz extracelular com osteócitos preenchendo as lâminas representaram osso com maior vitalidade, como observado na figura 12 (i).

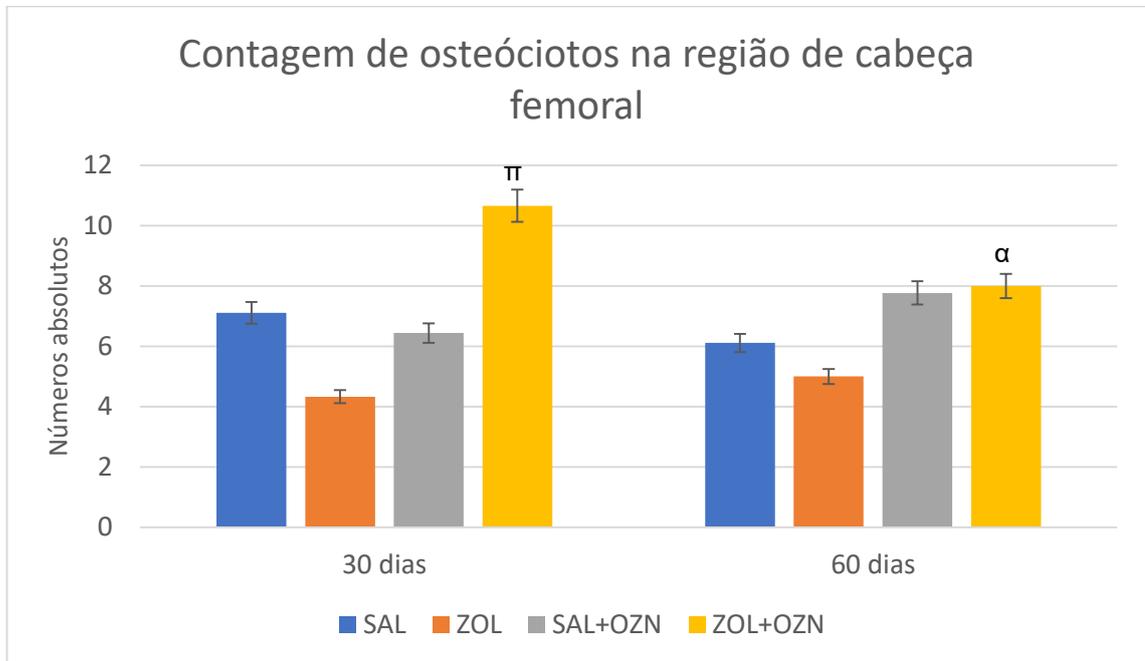
De forma quantitativa, no período de 30 dias mostrou que o grupo ZOL+OZN tinha maior número de osteócitos ($10,66\pm 3,31$), seguida do grupo SAL ($7,11\pm 1,36$), o qual não diferiu de SAL+OZN ($6,44\pm 2,29$) e, estes se apresentaram maiores que o grupo ZOL ($4,33\pm 2,06$). ($p < 0,05$) (**ZOL+OZN > SAL = SAL+OZN > ZOL**) (Figura 12). Aos 60 dias, somente a comparação ZOL+OZN ($8\pm 2,3$) vs ZOL ($5\pm 1,44$) apresentou relevância estatisticamente significativa ($p = 0,045$) (Figura 13).

FIGURA 12 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área de cabeça femoral buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número acentuado de osteócitos no grupo SAL+OZN (d) quando comparado aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN (a, b, c) no período de 30 dias (a, b, c, d). Já no período de 60 dias os grupos SAL+OZN e ZOL+OZN (h, i) possuem comportamento similar. Nos grupos SAL (f) e ZOL (g), o número de osteócitos foi menor. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25 μ m.



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 13 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região de cabeça femoral usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Aos 30 dias, observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos ZOL+OZN e os grupos SAL, ZOL e SAL+OZN. No período de 60 dias notou-se diferença estatística entre os grupos ZOL+OZN e ZOL.



Fonte: Autor, 2021

Já para a região de coluna vertebral, nenhuma diferença significativa foi encontrada para a quantidade de osteócitos aos 30 dias de análise, como pode ser notada na figura representativa 14 e nas comparações intergrupos. ($p > 0,05$, Teste Anova 1 fator) (Figura 15).

FIGURA 14 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área de coluna vertebral buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a), ZOL (b), SAL+OZN (c) e ZOL+OZN (d) nos períodos de 30 (a, b, c, d) dias. Observou-se número maior de osteócitos nos grupos SAL e SAL+OZN (a, c), os resultados foram aproximados entre os dois grupos ZOL e ZOL+OZN (b, d) que foram menores quando comparado aos grupos anteriores. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25 μ m.

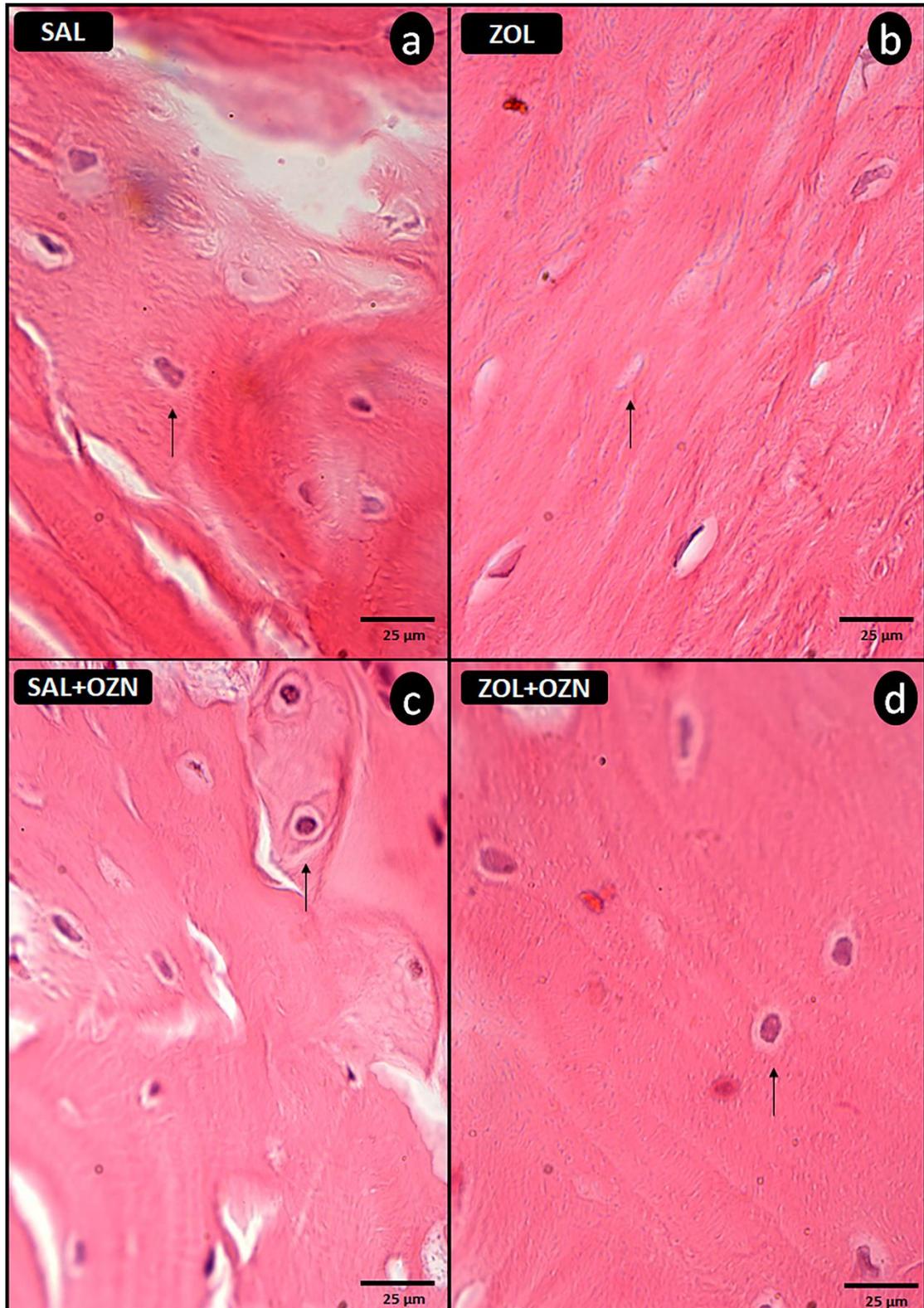
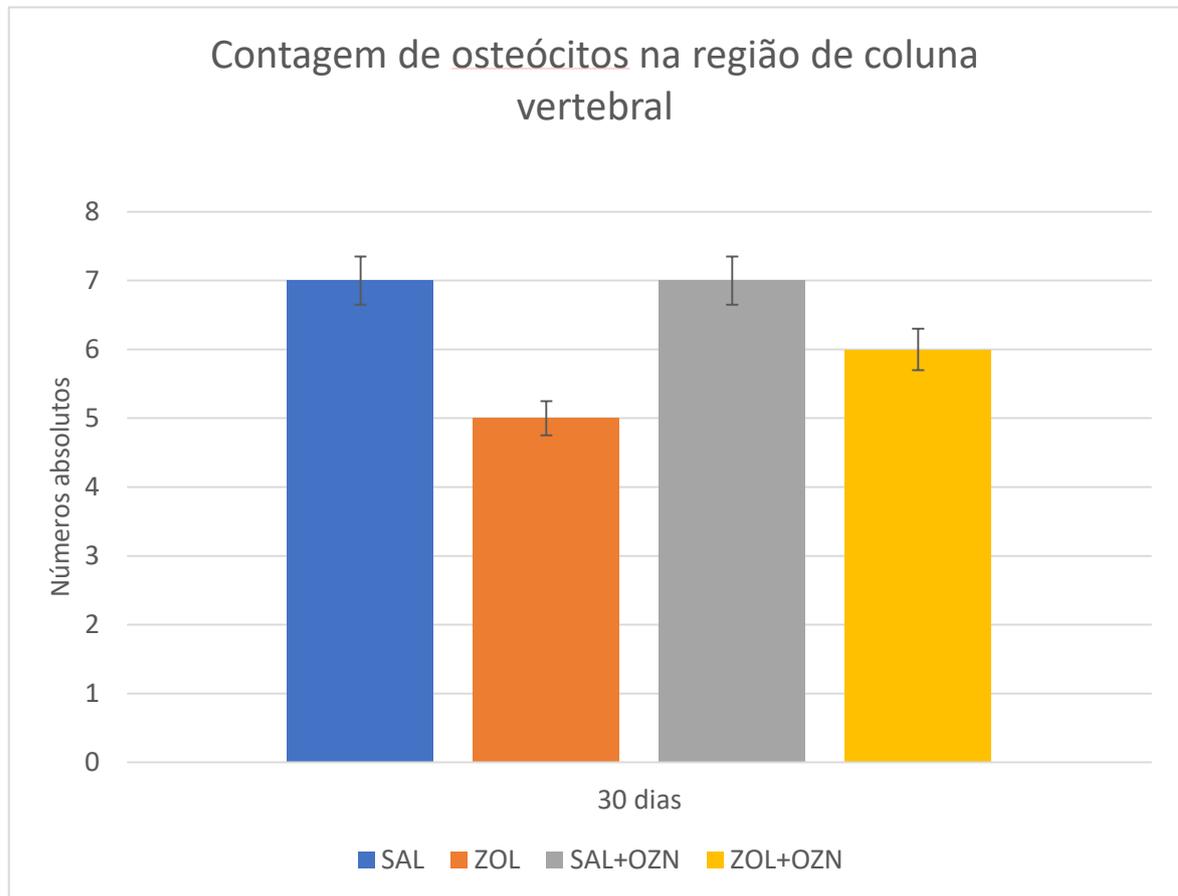


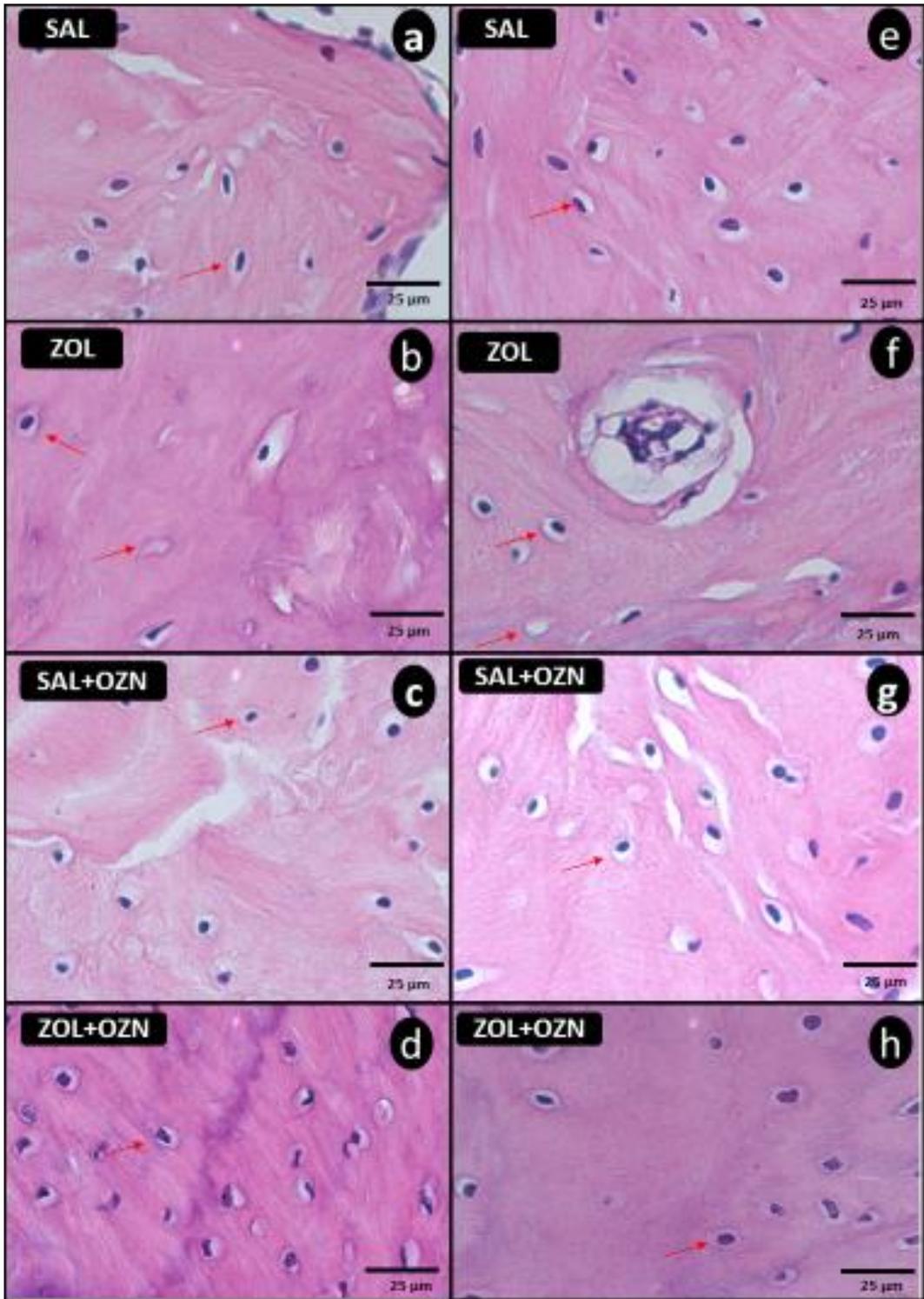
FIGURA 15 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região de coluna vertebral usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 dias. Os resultados estatísticos não foram significativos para os grupos analisados.



Fonte: Autor, 2021

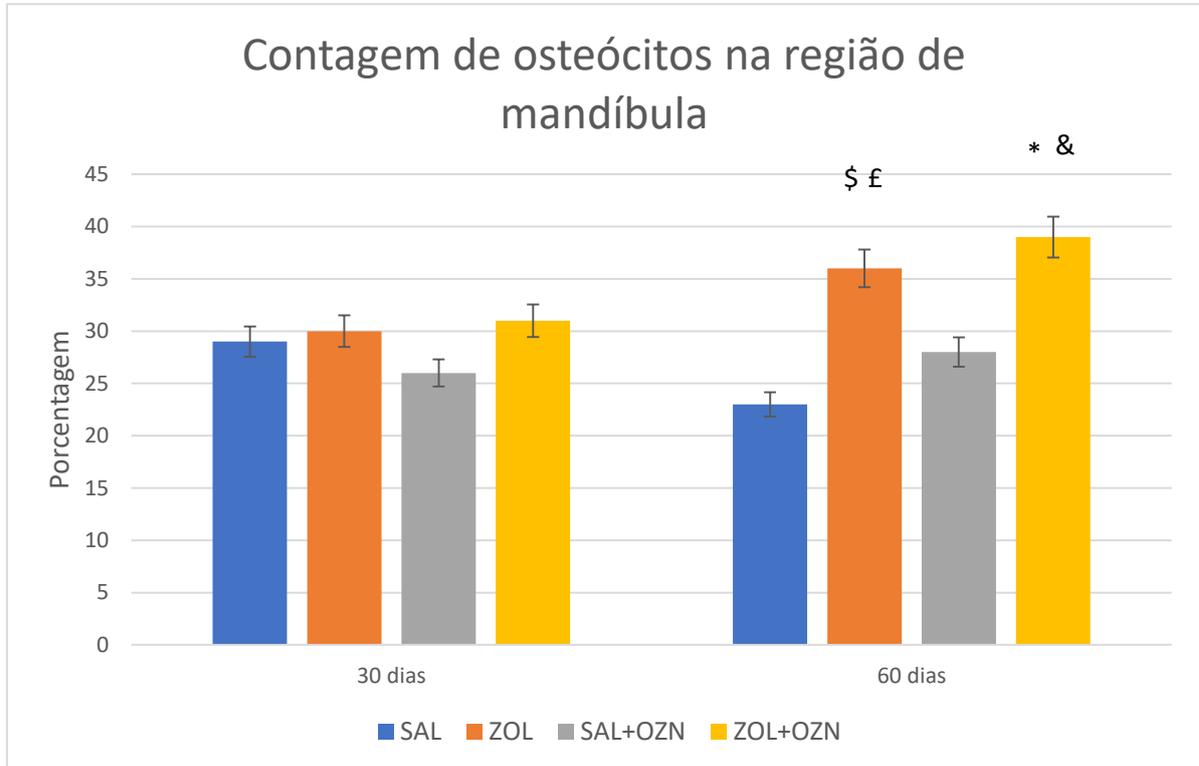
Para análise do número absoluto de osteócitos em região mandibular nos períodos de 30 e 60 dias. Para o período de 30 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL+OZN ($16\pm 2,9$) e os grupos SAL ($10\pm 2,1$), ZOL (8 ± 4) e SAL+OZN ($10\pm 2,9$), o resultado pode ser representado por (**ZOL+OZN>SAL=SAL=SAL+OZN**). Já para o período de 60 dias observou-se resultado estatisticamente relevante entre os grupos ZOL+OZN ($15\pm 1,7$) e os grupos SAL ($11\pm 6,4$) e ZOL ($9\pm 1,7$), o resultado pode ser representado da seguinte maneira (**ZOL+OZN>SAL=ZOL**) ($p>0,05$, Teste Anova 2 fatores) (Figuras 16 e 17).

FIGURA 16 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área mandibular buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número acentuado de osteócitos no grupo ZOL+OZN em comparação aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, já para o período de 60 dias os resultados são similares aos 30 dias onde o grupo ZOL+OZN apresentou resultados melhores quando comparado aos demais grupos SAL, ZOL, SAL+OZN. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada $25\mu m$.



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 17 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região mandibular usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. No período de 30 dias não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. No período de 60 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN, da mesma forma, foi observado resultado estatisticamente relevante na comparação do grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN.



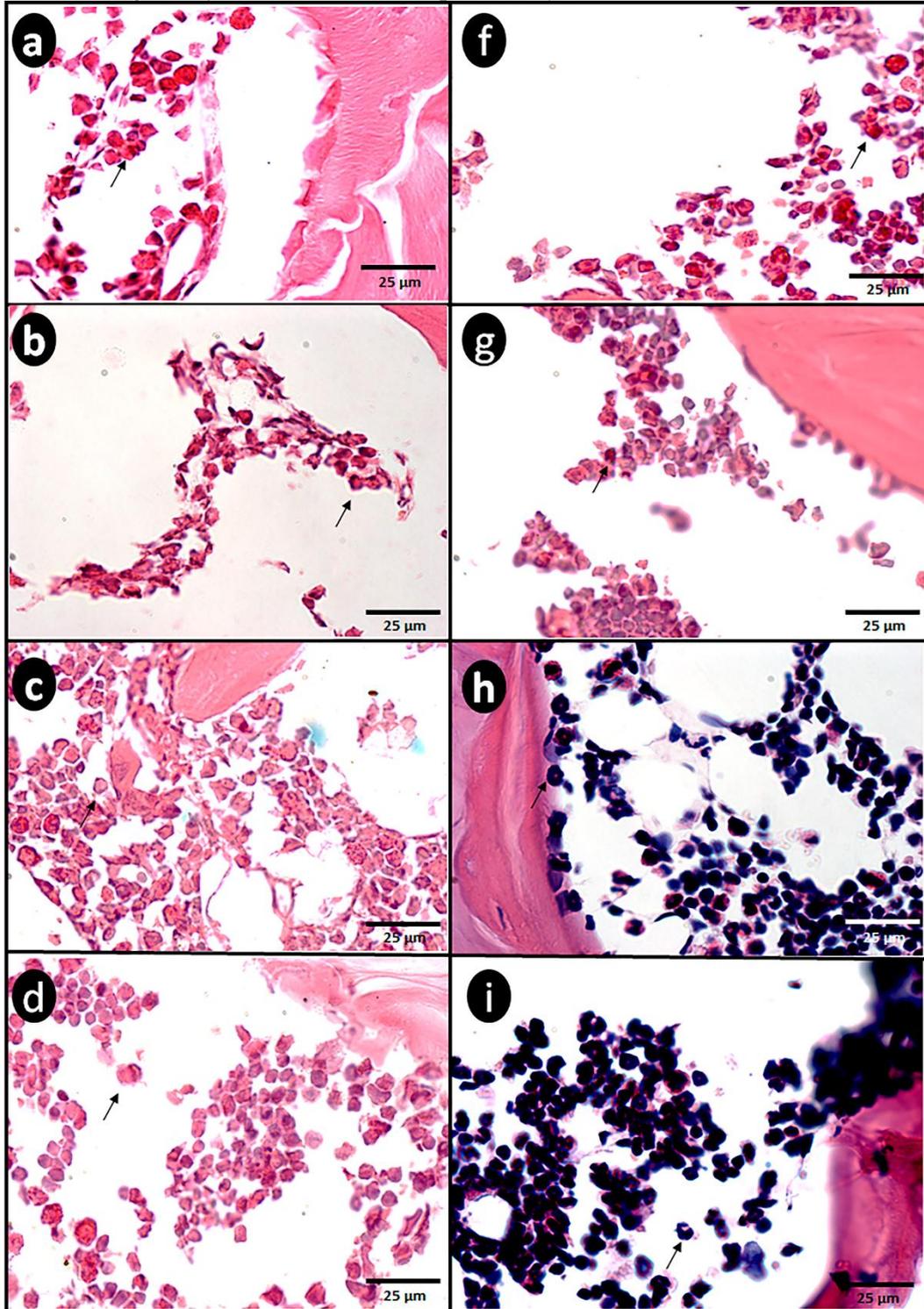
Fonte: Autor, 2021

3.4 Contagem de células inflamatórias

As imagens representativas do padrão inflamatório nas regiões de cabeça femoral, coluna vertebral e mandíbula podem ser visualizadas nas figuras 18, 20 e 22. Na região de cabeça femoral aos 60 dias, os grupos com a terapia OZN (SAL+OZN e ZOL+OZN) apresentam intenso infiltrado inflamatório, representada pelas células linfocitárias, já na coluna vertebral, os grupos apresentaram resposta inflamatória bem similar na comparação entre eles.

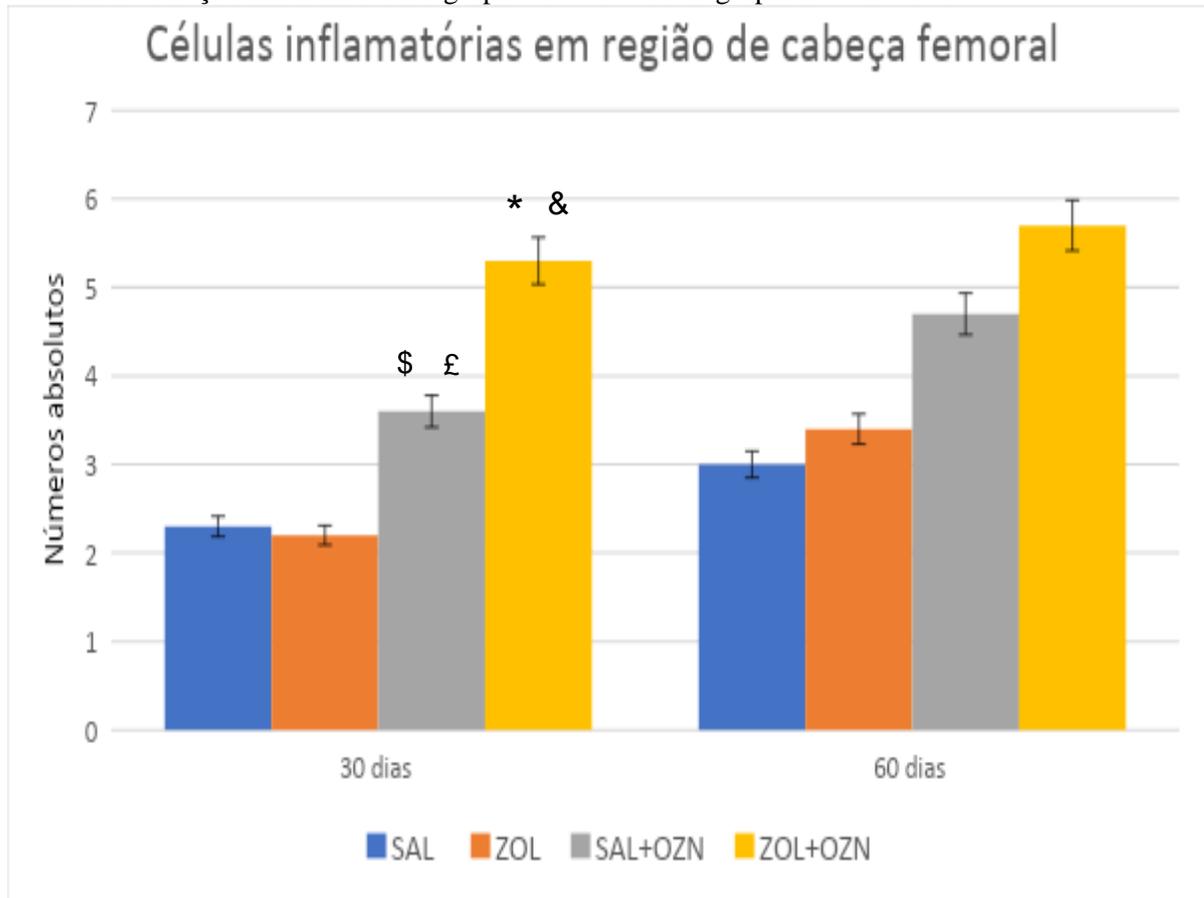
Para a contagem de células inflamatórias na região de cabeça femoral, os grupos que tiveram a aplicação do ozônio possuíram a maior quantidade de células aos 30 dias (ZOL+OZN: $5,3 \pm 4,38$ (\$, £) e SAL+OZN: $3,6 \pm 1,87$ (*, &)) em relação aos demais grupos (SAL: $2,3 \pm 2,23$ e ZOL: $2,22 \pm 1,92$); $p < 0,05$, em que na comparação entre os pares dessas interações não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Portanto, **ZOL+OZN=SAL+OZN>SAL=ZOL**. Aos 60 dias, todos os grupos apresentaram o mesmo comportamento inflamatório ($p > 0,05$) (Figura 19).

FIGURA 18 - Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de cabeça femoral, presentes nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número reduzido de células inflamatórias nos grupos SAL e ZOL. Já no grupo SAL+OZN e ZOL+OZN observa-se uma quantidade aumentada de células. Com esta característica, os resultados foram semelhantes tanto para o período de 30 quanto de 60 dias. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25 μ m.



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 19 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de cabeça femoral usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL, no período de 60 dias. Notou-se diferença estatística entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL.



Fonte: Autor, 2021

Para a região de coluna vertebral, a contagem de células inflamatórias não diferiu entre todos os grupos experimentais no tempo de 30 dias (Teste Anova 1 fator; $p=0,410$) (Figura 21).

FIGURA 20 - Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de coluna vertebral, presentes nos grupos SAL (a), ZOL (b), SAL+OZN (c) e ZOL+OZN (d) nos períodos de 30 (a, b, c, d) dias. Observa-se número semelhante de células inflamatórias nos grupos SAL, ZOL e SAL+OZN, porém nos grupos ZOL+OZN nota-se um aumento no número de linfócitos. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25 μ m.

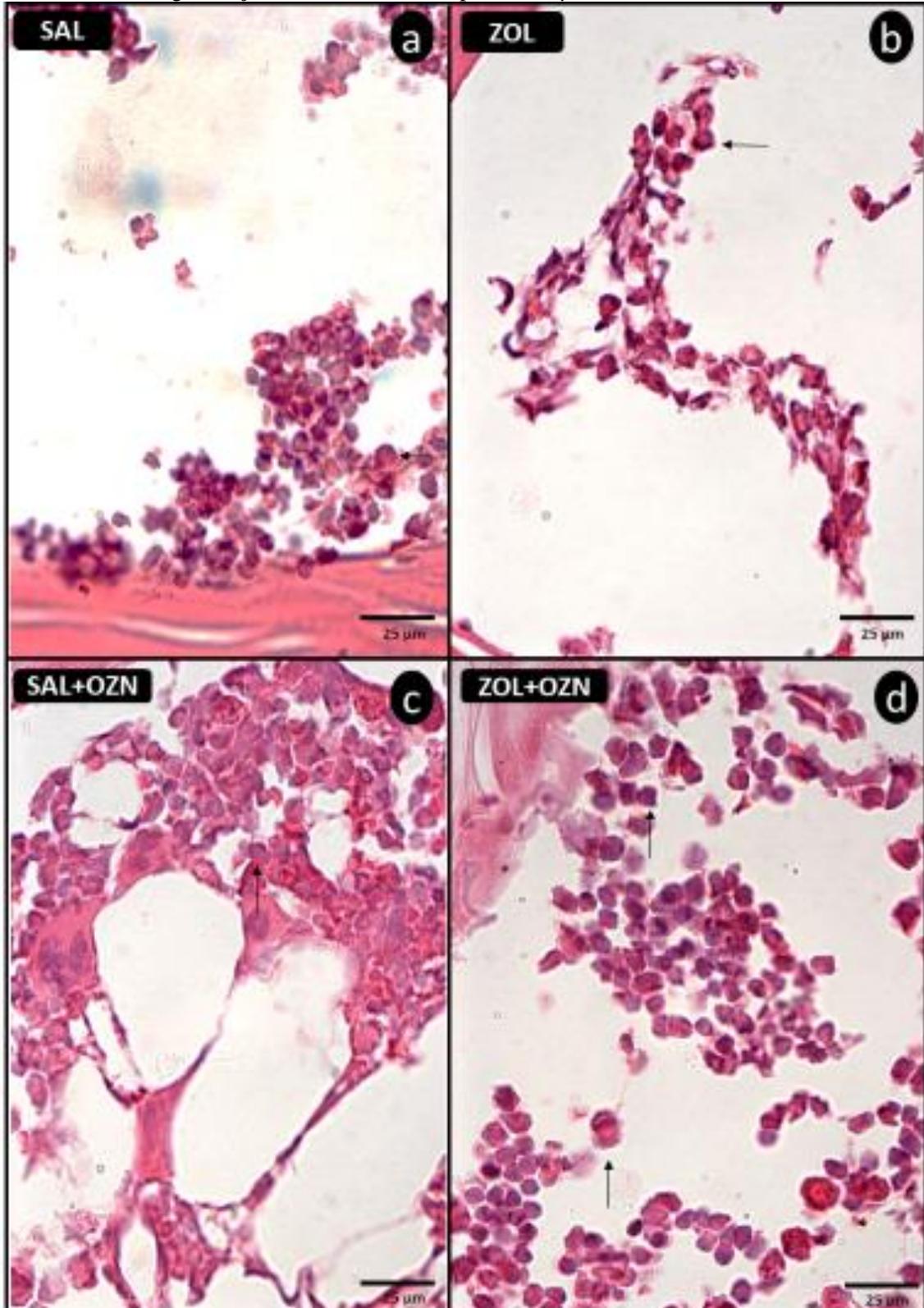
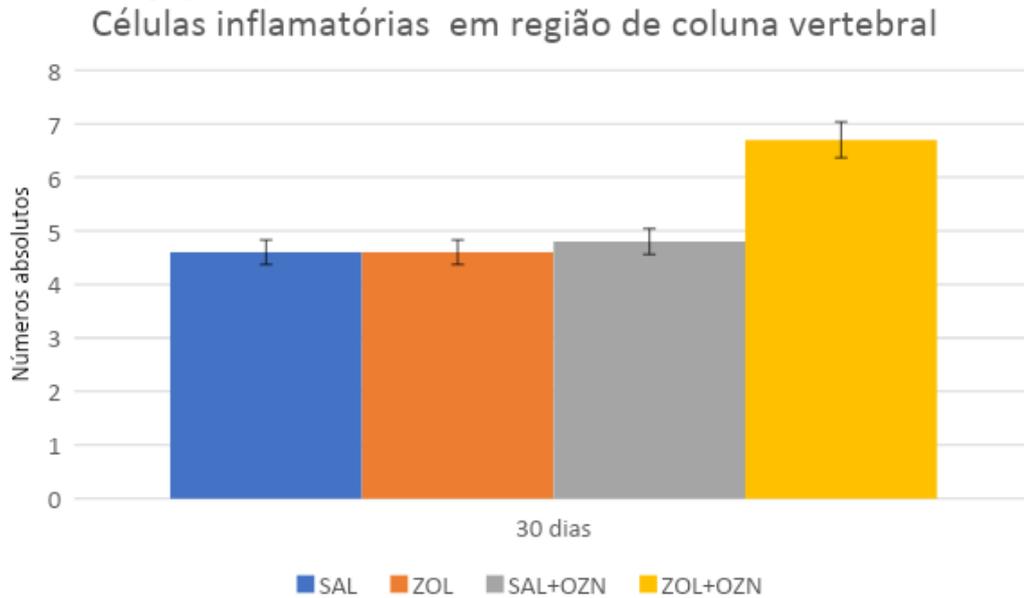


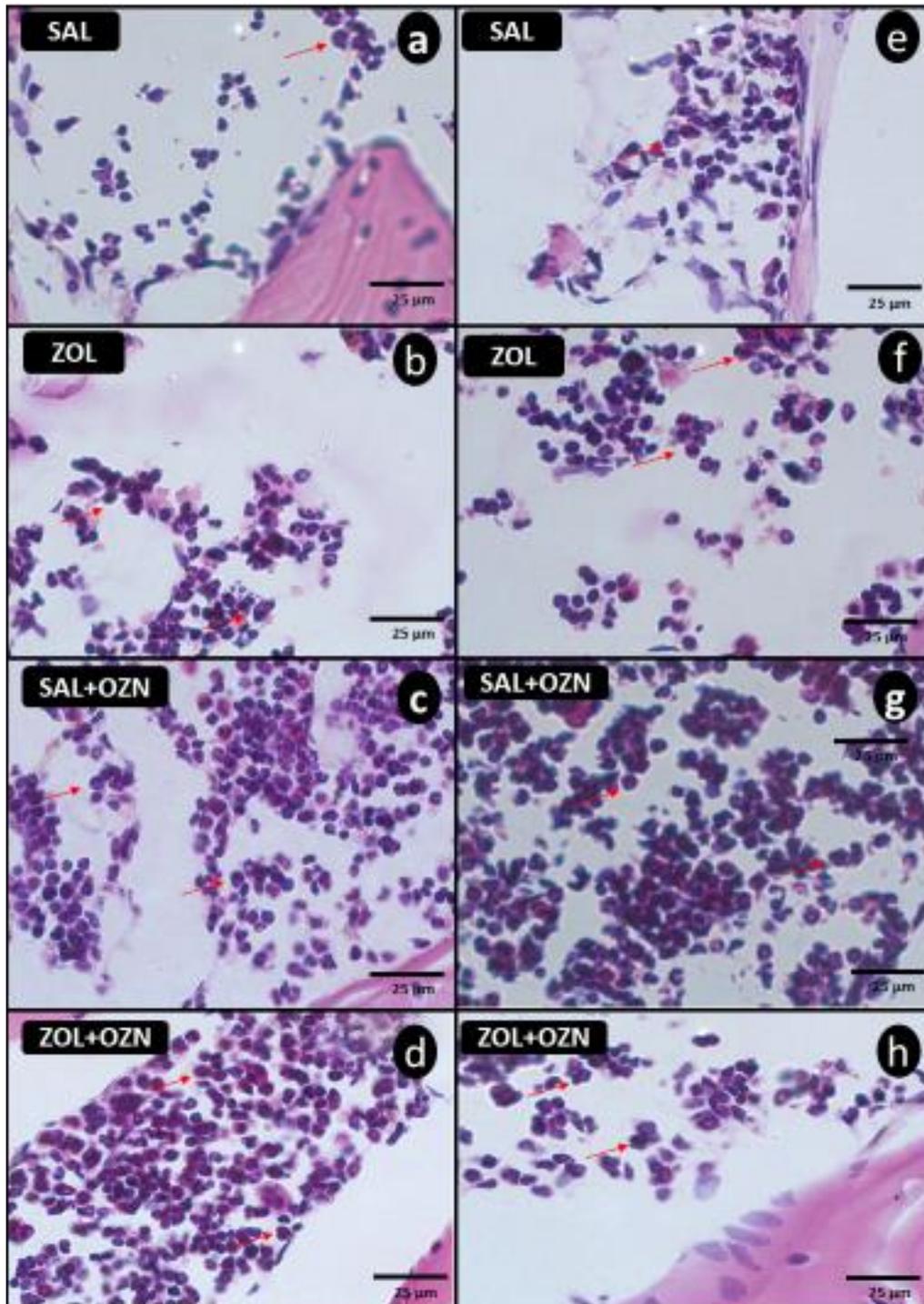
FIGURA 21 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de coluna vertebral usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 dias. Observou-se resultados sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.



Fonte: Autor, 2021

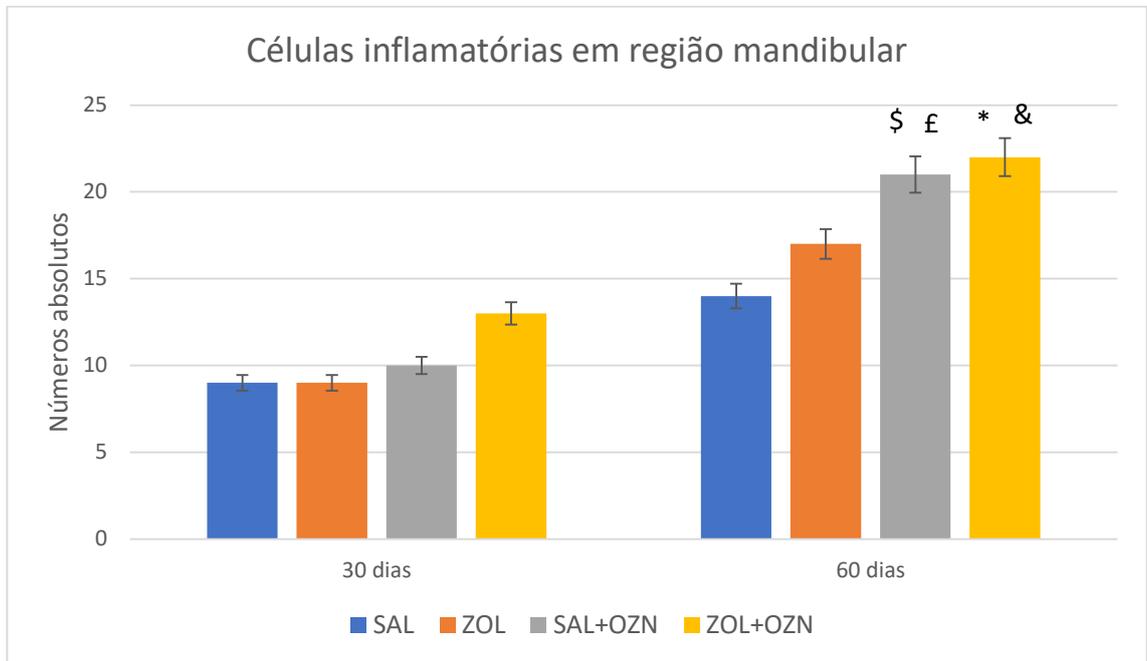
Já para região mandibular, o número de células inflamatórias seguiu a tendência dos resultados observados em cabeça femoral e coluna vertebral, no período de 30 dias não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos (SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN) que pode ser representado como $(SAL=ZOL=SAL+OZN=ZOL+OZN)$ (Teste Anova 2 fatores; $p>0,05$). Para o período de 60 dias observou-se tendência para repetição dos resultados, porém com diferença estatisticamente significativa entre os grupos (SAL+OZN $21,05\pm 6$ e ZOL+OZN $22,06\pm 4,8$) comparado aos grupos (SAL $14\pm 4,68$ e ZOL $17\pm 6,33$), os resultados podem ser representados da seguinte forma $(SAL+OZN=ZOL+OZN>SAL=ZOL)$. Teste Anova 2 fatores $p<0,05$) (figura 23).

FIGURA 22- Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de mandíbula, presentes nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número reduzido de células inflamatórias nos grupos SAL e ZOL. Já no grupo SAL+OZN e ZOL+OZN observa-se uma quantidade aumentada de células. Com esta característica, os resultados foram semelhantes tanto para o período de 30 quanto de 60 dias. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25 μ m.



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 23 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de mandíbula usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos SAL+OZN e ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL, no período de 60 dias. No período de 30 dias não foi observado estatisticamente relevante entre os grupos.



Fonte: Autor, 2021

3.5 Biópsia de órgãos de metabolismo e absorção

As figuras 24 a 28 evidenciam a representação das características histológicas dos tecidos e órgãos analisados.

O cérebro apresentou características microscópicas dentro da normalidade com presença acentuada de células, com evidenciação de células da glia e corpos neurais e substância branca com presença dentro da normalidade de fibras nervosas e prolongamentos celulares.

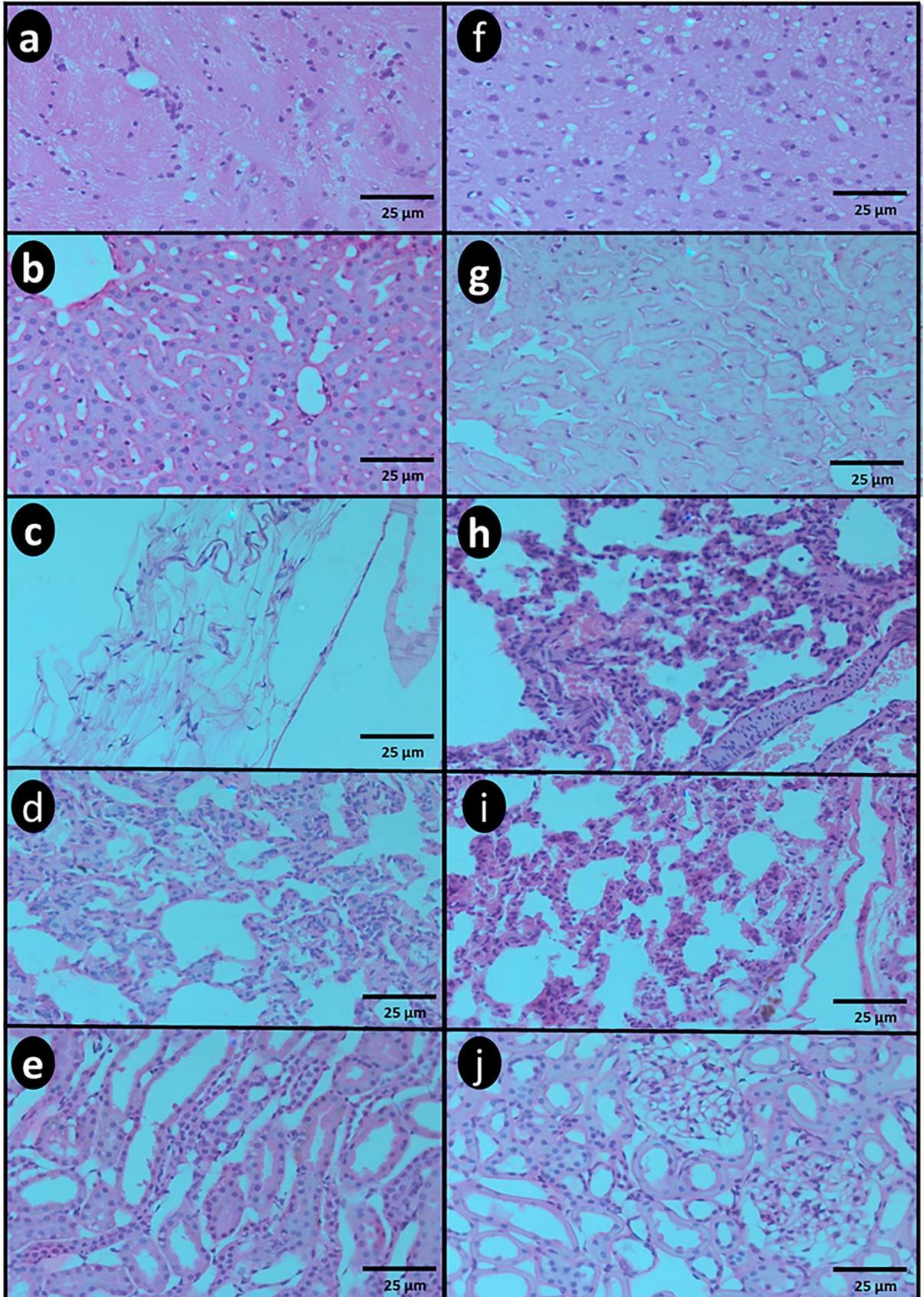
O fígado apresentou hepatócitos e lóbulos hepáticos com organização e estrutura dentro do padrão de normalidade com todos os elementos fundamentais presentes. O mesentério observa-se ampla quantidade de tecido conjuntivo frouxo, fibras e vasos. Buscando compreender melhor a região responsável pela absorção do ozônio, foi realizada a análise histológica da região do mesentério com uma magnificação de 1000x e observou-se estruturas histológicas dentro do padrão de normalidade do órgão.

O pulmão apresentou-se estruturalmente dentro dos padrões de normalidade com

estrutura alveolar, presença de células e vasos sanguíneos. O rim apresentou corpúsculo renal e células renais normais com organização e distribuição dentro dos padrões de normalidade.

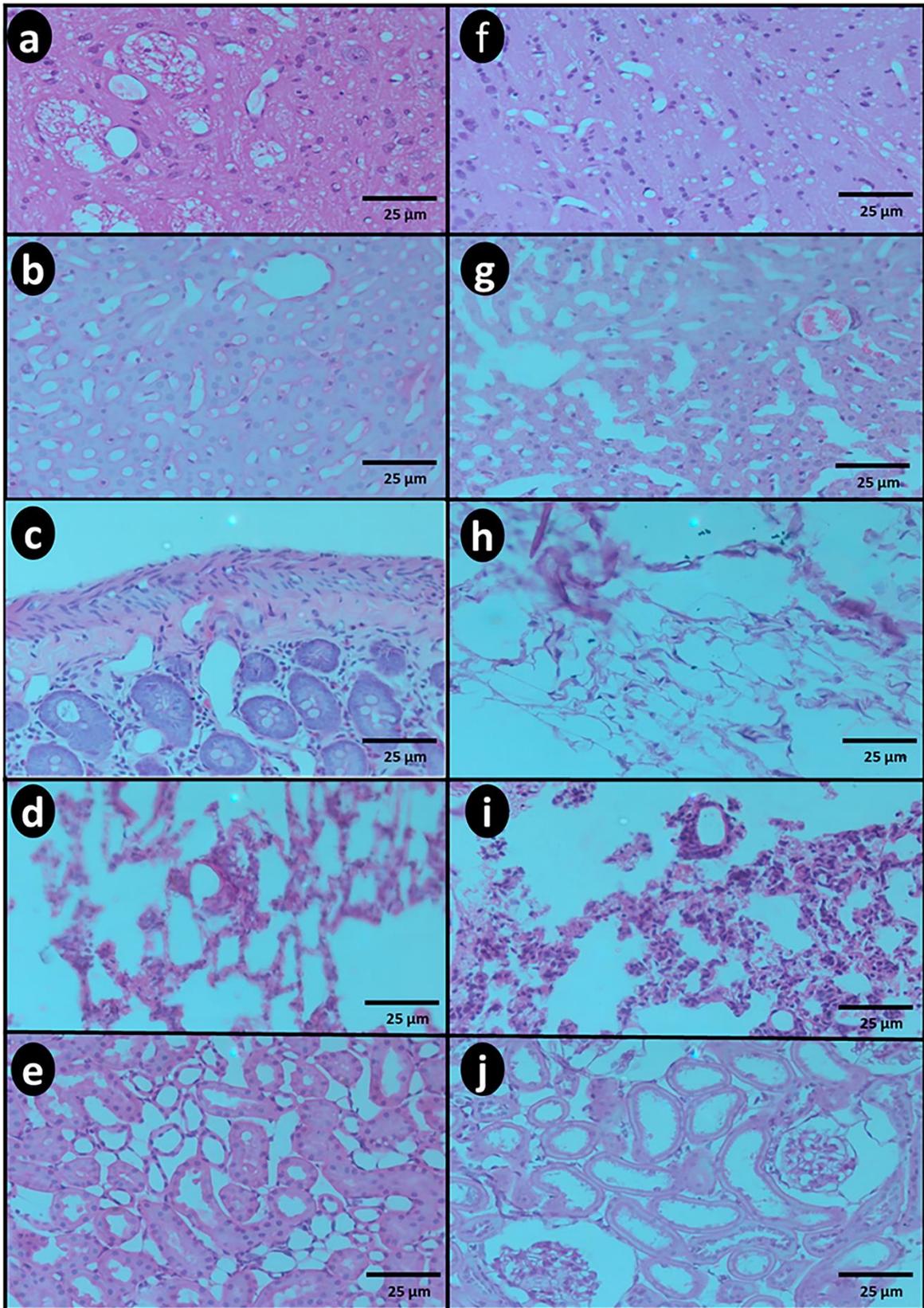
Deste modo, as medicações não causaram alterações significativas na morfologia e histologia dos órgãos analisados.

FIGURA 24 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais do grupo SAL: cérebro (a, f), fígado (b, g), mesentério (c, h), pulmão (d, i) e rim (e, j), nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 dias (f, g, h, i, j). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25 μ m.



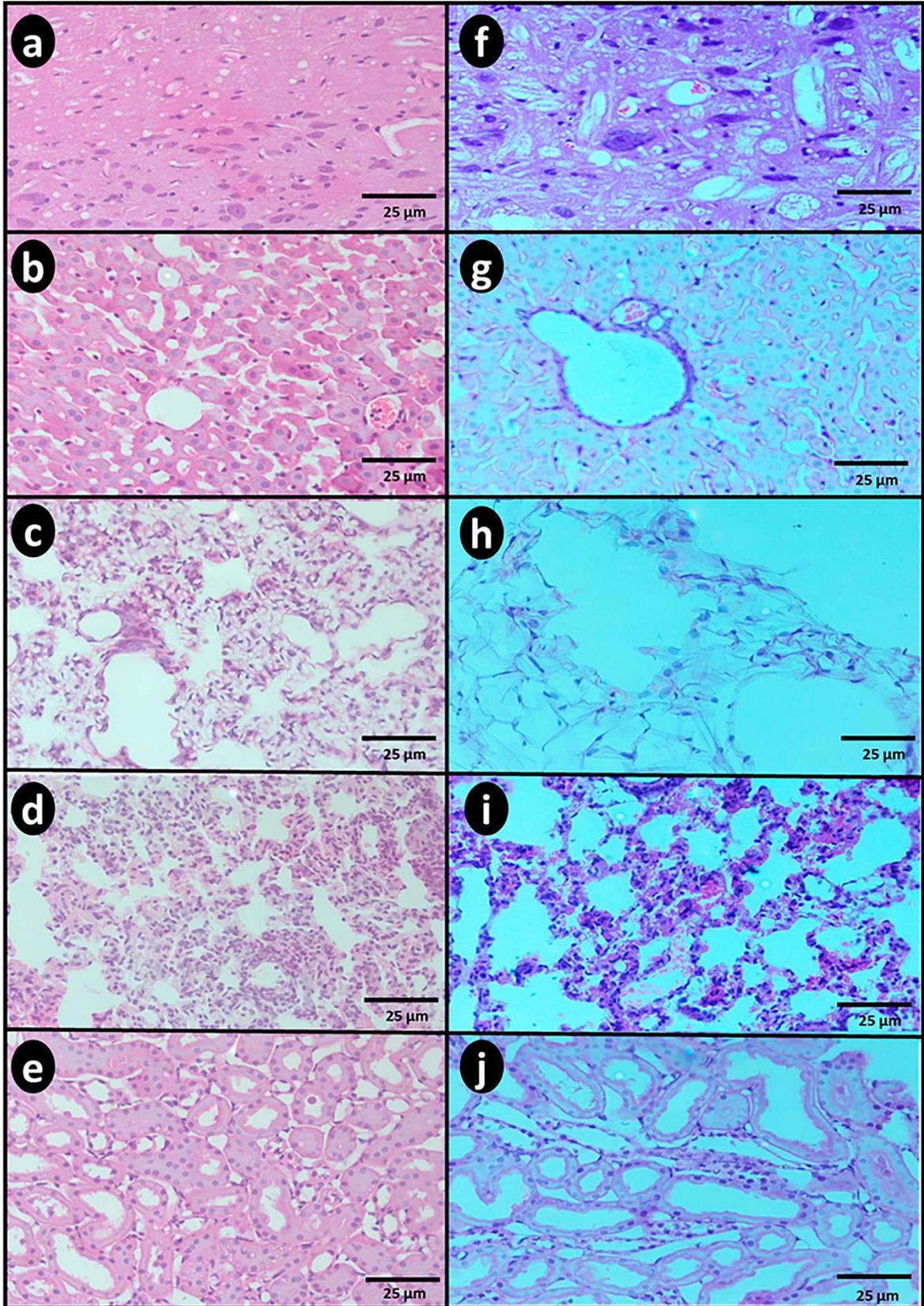
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 25 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais do grupo ZOL: cérebro (a, f), fígado (b, g), mesentério (c, h), pulmão (d, i) e rim (e, j), nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 dias (f, g, h, i, j). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25 μ m.



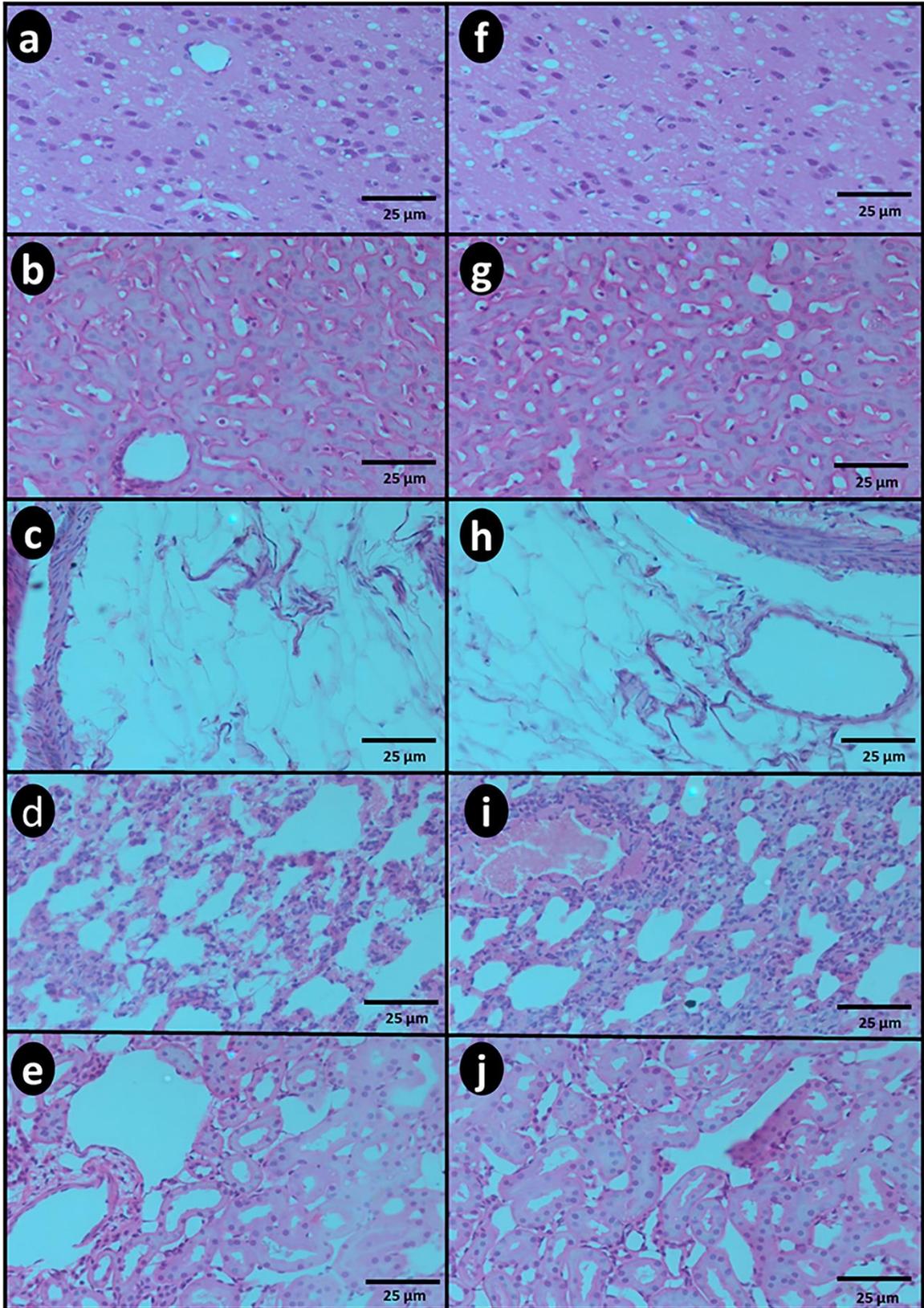
Fonte Autor, 2021

FIGURA 26 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais do grupo SAL+OZN: cérebro (a, f), fígado (b, g), mesentério (c, h), pulmão (d, i) e rim (e, j), nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 dias (f, g, h, i, j). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25µm.



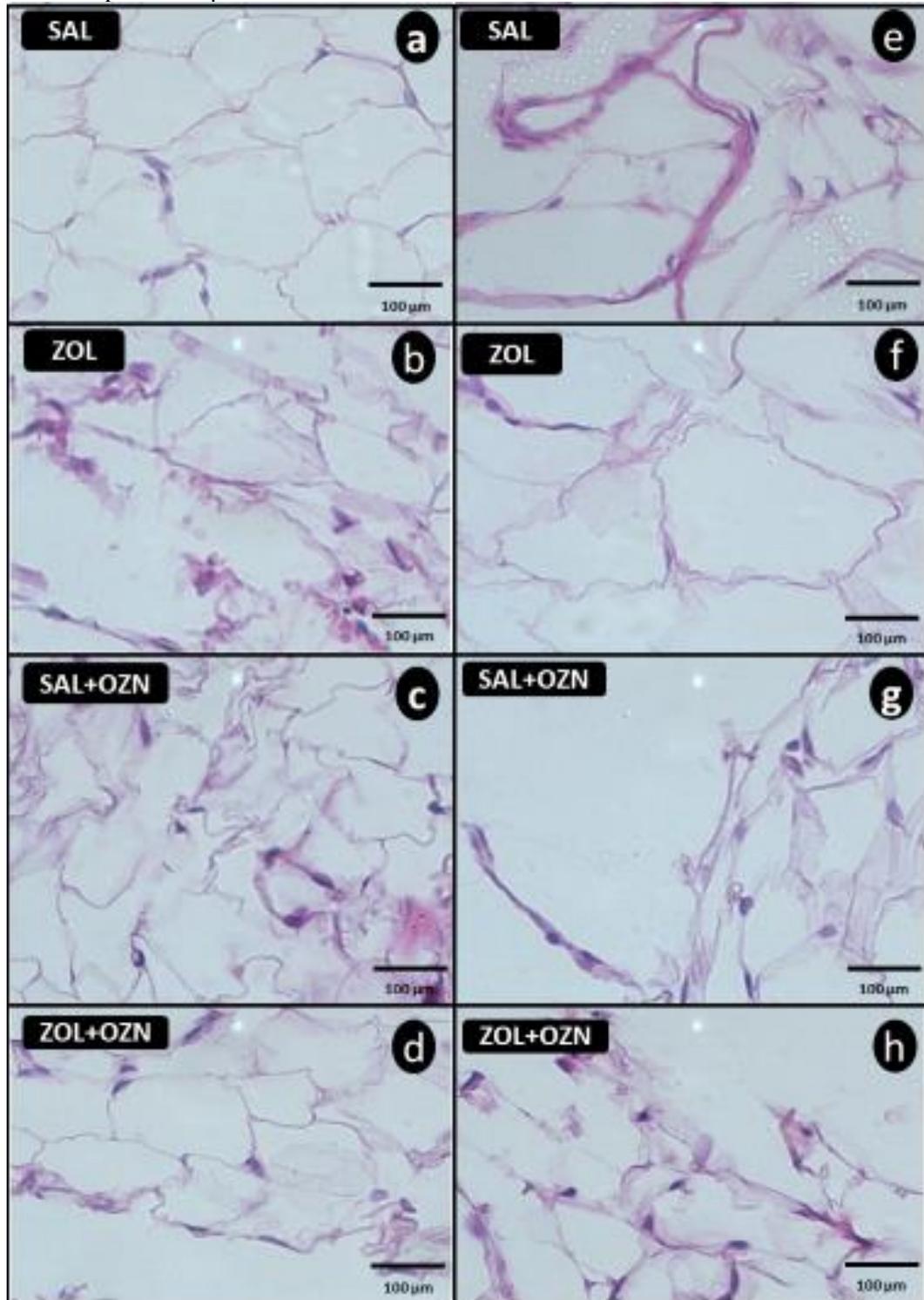
Fonte: Autor, 2021

FIGURA 27 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais do grupo ZOL+OZN: cérebro (a, f), fígado (b, g), mesentério (c, h), pulmão (d, i) e rim (e, j), nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 dias (f, g, h, i, j). Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25µm.



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 28 - Histologia representativa dos órgãos de metabolismo e absorção para os animais dos grupos SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) da região correspondente ao mesentério no período de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i, j) dias. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 400x. Escala aplicada 25 μ m.

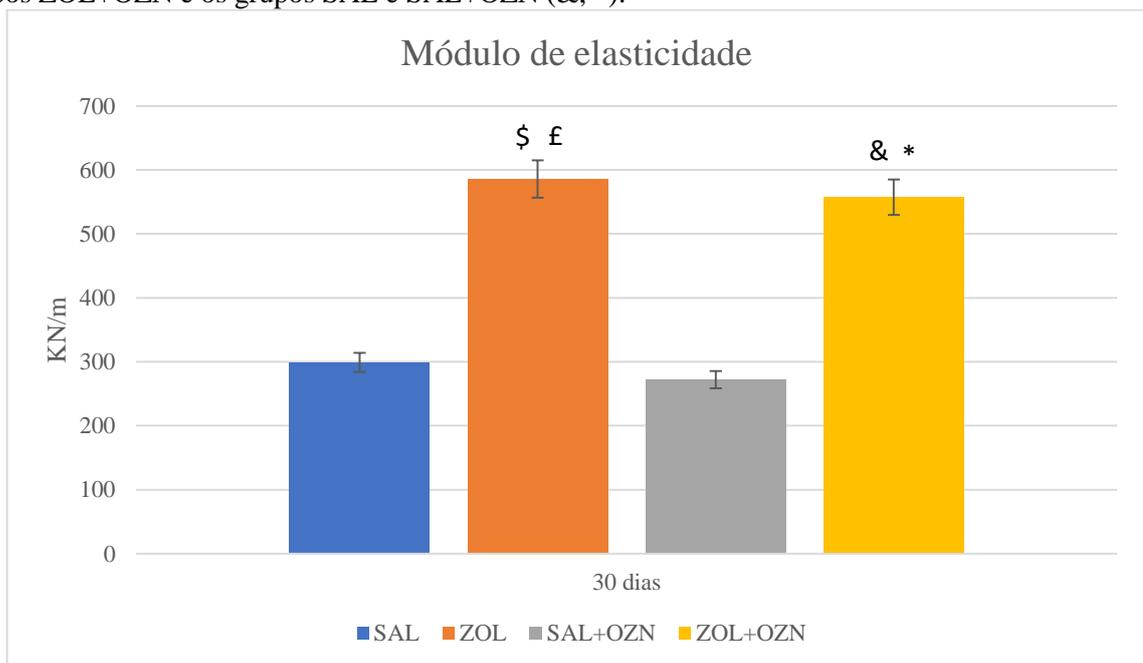


Fonte: Autor, 2021

3.6 Análise Biomecânica

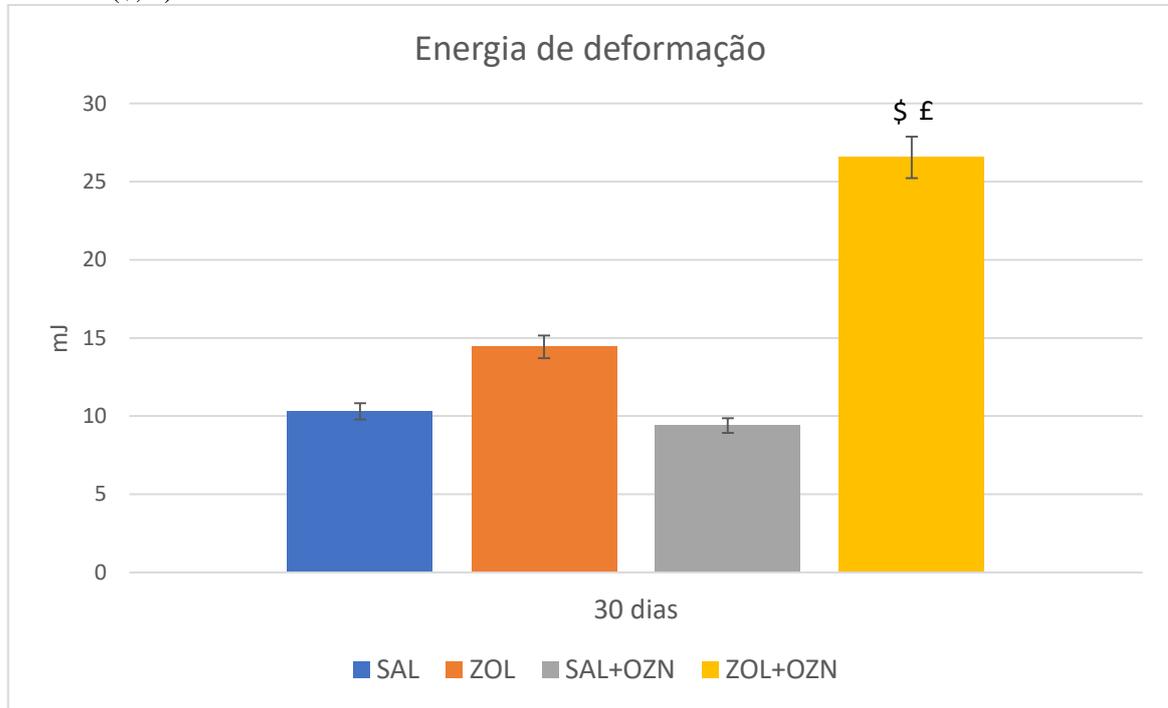
O módulo de elasticidade da região de colo femoral aos 30 dias apresentou os maiores dados para os grupos SAL+OZN ($272,13 \pm 30,37$) e ZOL+OZN ($557,31 \pm 146,16$), seguidos dos grupos SAL e ZOL ($p < 0,05$), possuindo as seguintes interações estatísticas: SAL+ZOL=ZOL+OZN > SAL=ZOL (Figura 29). Já para a análise necessária para deformar 0,3 mm o colo de femoral, que é definida como energia de deformação, observou-se diferença estatística para os grupos ZOL+OZN ($26,56 \pm 6,04$) e os grupos SAL ($10,3 \pm 1,1$) e SAL+OZN ($9,4 \pm 3,61$) ($p < 0,05$) (Figura 30).

FIGURA 29 - Gráfico representativo do módulo de elasticidade do teste biomecânico realizado na região de colo femoral referente aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN (\$, £), da mesma forma, foi observado resultados estatisticamente significantes na comparação dos grupos ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (&, *).



Fonte: Autor, 2021

FIGURA 30 - Gráfico representativo da energia de deformação do teste biomecânico realizado na região de colo femoral referente aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significante entre o grupo ZO+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (\$, £).



Fonte: Autor, 2021

4 DISCUSSÃO

As aplicações biomédicas do ozônio são relatadas para o reparo de feridas cutâneas, incorporação de enxertos e tratamento da doença periodontal (ELVIS; EKTA, 2011; OZDEMIR; TOKER; BALCI; OZER, 2013; STUBINGER; SADER; FILIPPI, 2006; STÜBINGER; SADER; FILIPPI, 2006; ZHANG; GUAN; XIE; LUO *et al.*, 2014), entretanto poucos estudos avaliaram a ação do ozônio sobre o metabolismo ósseo. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do ozônio sobre o dinamismo do metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas tratadas com ácido zoledrônico, e a hipótese apresentada previamente foi aceita, uma vez que os resultados mostraram que o grupo submetido a associação de terapias ZOL+OZN tiveram resultados superiores do ponto de vista histológico, histomorfométrico e biomecânico em comparação aos demais grupos SAL, ZOL e SAL+OZN.

Para esta comprovação, a avaliação histológica foi o primeiro passo, por meio da investigação da cronologia e padrão histológico dos grupos, bem como através da histometria, em que os grupos ZOL e ZOL+OZN foram os que apresentaram maior porcentagem de volume ósseo na região de cabeça femoral, coluna e mandíbula em comparação aos grupos SAL e SAL+OZN. Isso pode ser explicado pelo modelo animal utilizado, em que ratas ovariectomizadas com diminuição da densidade de volume ósseo esse resultado é esperado, já que o ácido zoledrônico tem a capacidade de inativar a atividade osteoclástica, inibição da RANKL e, conseqüentemente manter a quantidade/densidade de tecido ósseo (CANKAYA; CIZMECI SENEL; KADIOGLU DUMAN; MUCI *et al.*, 2013; LIMONES; SÁEZ-ALCAIDE; DÍAZ-PARREÑO; HELM *et al.*, 2020; RAMALHO-FERREIRA; FAVERANI; GROSSI-OLIVEIRA; OKAMOTO *et al.*, 2015).

A manutenção do tecido ósseo após a administração do ácido zoledrônico já é bem descrita na literatura, porém este osso apresenta-se com atividade biológica (dinamismo/"turnover") reduzida, levando a quadros importantes como perda de implantes (STAVROPOULOS; BERTL; PIETSCHMANN; PANDIS *et al.*, 2018) e osteonecrose dos maxilares (KHAN; MORRISON; HANLEY; FELSEBERG *et al.*, 2015; MARX, 2003; RUGGIERO, 2011; RUGGIERO; DODSON; FANTASIA; GOODDAY *et al.*, 2014). Na presente pesquisa, ao analisar o número de osteócitos na região de cabeça femoral, coluna e mandíbula foi uma alternativa para determinar a saúde/vitalidade do tecido ósseo destas regiões, em que os resultados promissores no grupo ZOL+OZN mostraram aumento significativo do número de osteócitos em comparação ao grupo ZOL, dando indícios que o ozônio além de

estimular leucócitos, eritrócitos, plaquetas, células endoteliais, o metabolismo, a microcirculação (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2008), aumentar o número de osteoblastos (OZDEMIR; TOKER; BALCI; OZER, 2013). Os resultados do presente estudo corroboram com Ozdemir *et al.* (2013) já que houve nos dois estudos uma suplementação da resposta biológica com o uso do OZN.

Compreendendo a melhora da resposta biológica do ozônio, optou-se pela realização da análise biomecânica na região de colo femoral. Sabe-se que as fraturas de colo de fêmur e coluna vertebral são as fraturas que mais ocorrem nos pacientes portadores de osteoporose grave e estão associadas à comorbidades severas e, a terapia com ácido zoledrônico é um dos tratamentos mais preconizados (CAULEY; CAWTHON; PETERS; CUMMINGS *et al.*, 2016; FINK; MACDONALD; FORTE; ROSEBUSH *et al.*, 2019; YOON; LEE; KIM; KIM *et al.*, 2013). Os resultados da biomecânica observados no estudo de (DAYISOYLU; SENEL; UNGOR; TOSUN *et al.*, 2013) mostram que a administração do ácido zoledrônico melhora consideravelmente as características biomecânicas dos ossos com baixa densidade, corroborando com os resultados deste estudo, em que se notou resultados biomecânicos superiores para os grupos submetidos ao tratamento com ZOL ($p < 0,05$).

A melhora das características biomecânicas e o aumento do número de osteócitos para o grupo ZOL+ZOL, inclusive apresentando diminuição expressiva dos osteoplastos vazios, provavelmente ocorre devido as características moduladoras do ozônio com estimulação do metabolismo do oxigênio e energia celular, propriedades imunomodularas, antioxidantes e de microcirculação (BAYER ALINCA; SAĞLAM; ZENGİN CELİK; HACISALİHOĞLU *et al.*, 2020; ERDEMCI; GUNAYDIN; SENCIMEN; BASSORGUN *et al.*, 2014; KAZANCIOĞLU; EZIRGANLI; DEMIRTAS, 2014). Assim, o ozônio modulou de forma considerável dinamismo ósseo, estimulando a deposição de matriz óssea vital nas ratas tratadas com ácido zoledrônico.

Os efeitos deletérios sobre a homeostase do tecido ósseo nos pacientes tratados com ácido zoledrônico são observados independente das doses utilizadas e da via de administração, o qual apresenta a maior potência dentro os bifosfonatos e com meia vida de 10 a 12 anos (RUGGIERO; DODSON; FANTASIA; GOODDAY *et al.*, 2014; SCHWARTZ, 2015). Sendo assim, nos ossos com maior sobrecarga mecânica como o fêmur, foi notado que a ação antirreabsortiva foi maior neste osso quando comparada à coluna vertebral, porque nos animais quadrúpedes como os desta pesquisa, a coluna não sofre um impacto mecânico tão importante quando comparado ao fêmur, deste modo, é possível justificar a resposta menos efetiva da

medicação. Já para a mandíbula, pode-se compreender que mesmo que os roedores de pequeno porte, como o rato, desenvolvendo maior força na “ação mastigatória” na região de incisivos, os molares apresentam uma ação de trituração e conseqüentemente, pode-se compreender os resultados mais evidentes da ação medicamentosa na mandíbula em comparação também a coluna. Portanto, mesmo em doses menores e em curtos períodos de tempo, o ácido zoledrônico é eficaz na diminuição da ação osteoclástica e deste modo, capaz de causar alterações no dinamismo de todo o esqueleto.

Na literatura há poucos relatos de casos de osteonecrose associada a bifosfonatos em ossos longos, áreas de importante sobrecarga mecânica, como tibia e fêmur (GUPTA; JAIN; KUMAR; PARIKH, 2009; HUANG; YANG; HSIEH, 2009; ROSSI; LASCIO; KOUROS; PAGANI, 2015). Para os especialistas e estudiosos da ortopedia, claramente o número desses casos irá aumentar diante do alto número de pacientes que utilizam a medicação para o tratamento de osteoporose. Deste modo, a aplicação do ozônio pode ser uma alternativa para esses pacientes, uma vez que no presente estudo estimulou a deposição de matriz óssea vital de forma mais acelerada nos animais tratados com ácido zoledrônico. Postula-se que o ozônio atua de modo sinérgico com o zoledronato, em que há a manutenção da massa óssea em ratas ovariectomizadas e um estímulo da deposição de tecido ósseo novo, já que devido a sua característica de estimulação da angiogênese, modula o metabolismo ósseo. Portanto, a associação dessas terapias pode ser favorável para a diminuição do surgimento de osteonecrose relacionada aos medicamentos, no espectro médico-odontológico.

Os efeitos adversos do ozônio são relatados por um estudo clássico de (MENZEL, 1984), em que o ozônio apresenta efeito molecular, alterando a oxidação de aminoácidos e ácidos graxos resultando em toxicidade e assim, levando a efeitos adversos de forma sistêmica. Porém o referido trabalho trata da inalação do ozônio por animais e humanos e muitas vezes uma administração contínua, contrapondo a via de administração deste trabalho, em que o ozônio foi aplicado por via intraperitoneal, em doses controladas e em períodos de dois em dois dias. A análise dos órgãos do metabolismo e de absorção mostrou estrutura macro e micro estrutural destes órgãos dentro do padrão de normalidade, deste modo, a administração controlada do ozônio não apresentou efeitos deletérios aos tecidos analisados.

Compreendendo que o ozônio é uma medicação que atua de forma sistêmica no metabolismo do oxigênio e apresenta efeitos antioxidantes (SOARES; MORAIS; ARAÚJO; MEYER *et al.*, 2019), observou-se um aumento no número de células inflamatórias, linfócitos, nos animais submetidos a terapia com ozônio nas regiões de cabeça de fêmur, coluna e

mandíbula. Pode ser justificado pelo mecanismo de ação do ozônio nos tecidos, onde peróxidos produzidos pelo ozônio regulam moléculas antioxidantes nas células vermelhas, liberando citocinas, fatores de crescimento, autacóides e deste modo, favorecendo o metabolismo (SOARES; MORAIS; ARAÚJO; MEYER *et al.*, 2019; TRAVAGLI; ZANARDI; BERNINI; NEPI *et al.*, 2010). Pode-se postular desta forma que o ozônio atua estimulando o sistema hematopoiético e, por conseguinte, o aumento de células inflamatórias é justificado, porém sem efeitos deletérios, já que os órgãos de metabolismo e absorção mantiveram sua estrutura normal.

O estudo apresentou limitações, principalmente em relação ao tempo de administração do ácido zoledrônico e na correlação entre um estudo experimental e a clínica para o tratamento da osteoporose. Os resultados obtidos são vistos em um curto período de tempo, já que a medicação antirreabsortiva apresenta uma meia vida de pelo menos 10 anos. Compreender a ação sinérgica entre o ozônio e o ácido zoledrônico em um longo período de tempo é fundamental, deste modo, é importante observar também, a ação do ozônio nos tecidos em aplicações controladas e determinadas no longo prazo.

Outra questão importante é a aplicação clínica do ozônio sistêmico, pois a via intraperitoneal apresenta uma morbidade considerável, outro ponto importante é o ajuste de dose para que os pacientes tenham o mesmo efeito sinérgico observados nos animais. Pode-se entender que o modelo animal apresenta uma limitação no tocante a biomecânica, visto que, o modelo de marcha quadrupede é diferente do humano e deste modo, existe a suposição que a repercussão das medicações será diferente principalmente na coluna.

Para novos estudos é importante entender a ação do ozônio associado ao ácido zoledrônico em modelos experimentais de doenças sistêmicas, tais como diabetes, hipertensão, hepatopatias e nefropatias. Outro ponto importante será analisar a ação do ozônio e sua sinergia no longo prazo com alternativas obtendo vias de administração com menor morbidade, como por exemplo, pela via nasal, subcutânea ou até mesmo pela via enteral. Outra possibilidade de estudo é a observação clínica do comportamento da coluna vertebral em pacientes osteoporóticos tratados com ozônio e ácido zoledrônico, visto que, a biomecânica é completamente diferente do modelo animal utilizado neste estudo. Por fim, o presente estudo analisa apenas o comportamento do tecido ósseo sem qualquer tipo de injúria, sendo assim, avaliar os mecanismos em função de modelos de fraturas ósseas e sítios de extrações dentárias são de fundamental importância para as propostas futuras.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o ozônio apresenta comportamento sinérgico positivo quando usado no tratamento de ratas com baixa densidade óssea e tratadas com ácido zoledrônico. O ozônio apresentou a capacidade de estimular a dinâmica dos ossos da cabeça femoral, coluna e mandíbula, em que o número de osteócitos, porcentagem de volume ósseo e células inflamatórias foi maior no grupo ZOL+OZN quando comparado ao grupo tratado apenas com ácido zoledrônico.

A terapia com ozônio não causou nenhuma alteração deletéria aos órgãos e tecidos de metabolização ou absorção, sendo assim, a administração pela via intraperitoneal no modelo experimental estudado se mostrou segura.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, A. L.; ADAMS, J. L.; RAEBEL, M. A.; TANG, B. T. *et al.* Bisphosphonate Drug Holiday and Fracture Risk: A Population-Based Cohort Study. **J Bone Miner Res**, 33, n. 7, p. 1252-1259, Jul 2018.
- AZARPAZHOOH, A.; LIMEBACK, H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. **J Dent**, 36, n. 2, p. 104-116, Feb 2008.
- BAYER ALINCA, S.; SAĞLAM, E.; ZENGİN CELİK, T.; HACISALİHOĞLU, P. *et al.* Is low level laser therapy or ozone therapy more effective for bone healing? Understanding the mechanisms of HIF-1 α , RANKL and OPG. **Biotech Histochem**, 95, n. 8, p. 597-604, Nov 2020.
- BERGSTROM, U.; JONSSON, H.; GUSTAFSON, Y.; PETTERSSON, U. *et al.* The hip fracture incidence curve is shifting to the right. **Acta Orthop**, 80, n. 5, p. 520-524, Oct 2009.
- BETH-TASDOGAN, N. H.; MAYER, B.; HUSSEIN, H.; ZOLK, O. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. **Cochrane Database Syst Rev**, 10, n. 10, p. Cd012432, Oct 6 2017.
- BIVER, E.; FERRARI, S. [Osteoporosis]. **Rev Med Suisse**, 16, n. 676-7, p. 78-80, Jan 15 2020.
- BOUXSEIN, M. L.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, 25, n. 7, p. 1468-1486, Jul 2010.
- CALIRI, A.; DE FILIPPIS, L.; BAGNATO, G. L.; BAGNATO, G. F. Osteoporotic fractures: mortality and quality of life. **Panminerva Med**, 49, n. 1, p. 21-27, Mar 2007.
- CANKAYA, M.; CIZMECI SENEL, F.; KADIOĞLU DUMAN, M.; MUCI, E. *et al.* The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 42, n. 9, p. 1134-1139, Sep 2013.
- CAULEY, J. A.; CAWTHON, P. M.; PETERS, K. E.; CUMMINGS, S. R. *et al.* Risk Factors for Hip Fracture in Older Men: The Osteoporotic Fractures in Men Study (MrOS). **J Bone Miner Res**, 31, n. 10, p. 1810-1819, Oct 2016.
- CHEN, C. H.; WANG, L.; SERDAR TULU, U.; ARIOKA, M. *et al.* An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair. **Bone**, 112, p. 212-219, Jul 2018.
- CHEN, H.; ZHOU, X.; EMURA, S.; SHOUMURA, S. Site-specific bone loss in senescence-accelerated mouse (SAMP6): a murine model for senile osteoporosis. **Exp Gerontol**, 44, n. 12, p. 792-798, Dec 2009.
- CHEN, L.; YANG, L.; YAO, M.; CUI, X. J. *et al.* Biomechanical Characteristics of Osteoporotic Fracture Healing in Ovariectomized Rats: A Systematic Review. **PLoS One**, 11, n. 4, p. e0153120, 2016.
- COLELLA, G.; CAMPISI, G.; FUSCO, V. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper: Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws-2009 update: the need to refine the BRONJ definition. *In: J Oral Maxillofac Surg*. United States, 2009. v.

67, p. 2698-2699.

DAL PRÁ, K. J.; LEMOS, C. A.; OKAMOTO, R.; SOUBHIA, A. M. *et al.* Efficacy of the C-terminal telopeptide test in predicting the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 46, n. 2, p. 151-156, Feb 2017.

DAVIS, S.; MARTYN-ST JAMES, M.; SANDERSON, J.; STEVENS, J. *et al.* A systematic review and economic evaluation of bisphosphonates for the prevention of fragility fractures. **Health Technol Assess**, 20, n. 78, p. 1-406, Oct 2016.

DAYISOYLU, E. H.; SENEL, F. C.; UNGOR, C.; TOSUN, E. *et al.* The effects of adjunctive parathyroid hormone injection on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an animal study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 42, n. 11, p. 1475-1480, Nov 2013.

ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. Ozone therapy: A clinical review. **J Nat Sci Biol Med**, 2, n. 1, p. 66-70, Jan 2011.

ERDEMCI, F.; GUNAYDIN, Y.; SENCIMEN, M.; BASSORGUN, I. *et al.* Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 43, n. 6, p. 777-783, Jun 2014.

FINK, H. A.; MACDONALD, R.; FORTE, M. L.; ROSEBUSH, C. E. *et al.* Long-Term Drug Therapy and Drug Discontinuations and Holidays for Osteoporosis Fracture Prevention: A Systematic Review. **Ann Intern Med**, 171, n. 1, p. 37-50, Jul 2 2019.

GOVAERTS, D.; PICCART, F.; OCKERMAN, A.; COROPCIUC, R. *et al.* Adjuvant therapies for MRONJ: A systematic review. **Bone**, 141, p. 115676, Dec 2020.

GUPTA, S.; JAIN, P.; KUMAR, P.; PARIKH, P. M. Zoledronic acid induced osteonecrosis of tibia and femur. *In: Indian J Cancer*. India, 2009. v. 46, p. 249-250.

HAO, Y.; WANG, X.; WANG, L.; LU, Y. *et al.* Zoledronic acid suppresses callus remodeling but enhances callus strength in an osteoporotic rat model of fracture healing. **Bone**, 81, p. 702-711, Dec 2015.

HU, W.; WANG, H.; SHI, X.; SONG, Y. *et al.* Effect of Preoperative Zoledronic Acid Administration on Pain Intensity after Percutaneous Vertebroplasty for Osteoporotic Vertebral Compression Fractures. **Pain Res Manag**, 2020, p. 8039671, 2020.

HUANG, K. Y.; YANG, R. S.; HSIEH, C. C. Simultaneous osteonecrosis and osteomyelitis in a patient with cancer of the breast. **J Bone Joint Surg Br**, 91, n. 9, p. 1249-1251, Sep 2009.

KAN, B.; SENCIMEN, M.; BAYAR, G. R.; KORKUSUZ, P. *et al.* Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. **J Oral Maxillofac Surg**, 73, n. 6, p. 1231.e1231-1210, Jun 2015.

KAZANCIOGLU, H. O.; EZIRGANLI, S.; DEMIRTAS, N. Comparison of the influence of ozone and laser therapies on pain, swelling, and trismus following impacted third-molar surgery. **Lasers Med Sci**, 29, n. 4, p. 1313-1319, Jul 2014.

KENDLER, D.; CHINES, A.; CLARK, P.; EBELING, P. R. *et al.* Bone Mineral Density After Transitioning From Denosumab to Alendronate. **J Clin Endocrinol Metab**, 105, n. 3, p. e255-264, Mar 1 2020.

- KHAJURIA, D. K.; VASIREDDI, R.; TREBBIN, M.; KARASIK, D. *et al.* Novel therapeutic intervention for osteoporosis prepared with strontium hydroxyapatite and zoledronic acid: In vitro and pharmacodynamic evaluation. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 71, p. 698-708, Feb 1 2017.
- KHAN, A. A.; MORRISON, A.; HANLEY, D. A.; FELSEMBERG, D. *et al.* Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. **J Bone Miner Res**, 30, n. 1, p. 3-23, Jan 2015.
- KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. **Lancet Diabetes Endocrinol**, 5, n. 11, p. 898-907, Nov 2017.
- KOCA, K.; YURTTAS, Y.; BILGIC, S.; CAYCI, T. *et al.* Effect of preconditioned hyperbaric oxygen and ozone on ischemia-reperfusion induced tourniquet in skeletal bone of rats. **J Surg Res**, 164, n. 1, p. e83-89, Nov 2010.
- KYRGIDIS, A.; TOULIS, K. A. Denosumab-related osteonecrosis of the jaws. **Osteoporos Int**, 22, n. 1, p. 369-370, Jan 2011.
- LEDER, B. Z.; MITLAK, B.; HU, M. Y.; HATTERSLEY, G. *et al.* Effect of Abaloparatide vs Alendronate on Fracture Risk Reduction in Postmenopausal Women With Osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, 105, n. 3, p. 938-943, Mar 1 2020.
- LEGEROS, R. Z.; CRAIG, R. G. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. **J Bone Miner Res**, 8 Suppl 2, p. S583-596, Dec 1993.
- LIMONES, A.; SÁEZ-ALCAIDE, L. M.; DÍAZ-PARREÑO, S. A.; HELM, A. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) in cancer patients treated with denosumab VS. zoledronic acid: A systematic review and meta-analysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 25, n. 3, p. e326-e336, May 1 2020.
- LIU, Z.; LI, C. W.; MAO, Y. F.; LIU, K. *et al.* Study on Zoledronic Acid Reducing Acute Bone Loss and Fracture Rates in Elderly Postoperative Patients with Intertrochanteric Fractures. **Orthop Surg**, 11, n. 3, p. 380-385, Jun 2019.
- MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *In: J Oral Maxillofac Surg*. United States, 2003. v. 61, p. 1115-1117.
- MARX, R. E.; CILLO, J. E., JR.; ULLOA, J. J. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. **J Oral Maxillofac Surg**, 65, n. 12, p. 2397-2410, Dec 2007.
- MENZEL, D. B. Ozone: an overview of its toxicity in man and animals. **J Toxicol Environ Health**, 13, n. 2-3, p. 183-204, 1984.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY, A. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. *In: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington (DC): National Academies Press (US) Copyright © 2011, National Academy of Sciences., 2011.
- OLEJNIK, C.; FALGAYRAC, G.; DURING, A.; CORTET, B. *et al.* Doses effects of zoledronic acid on mineral apatite and collagen quality of newly-formed bone in the rat's calvaria defect.

Bone, 89, p. 32-39, Aug 2016.

OZDEMIR, H.; TOKER, H.; BALCI, H.; OZER, H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. **J Periodontal Res**, 48, n. 6, p. 722-726, Dec 2013.

PEDEN, M. Global collaboration on road traffic injury prevention. **Int J Inj Contr Saf Promot**, 12, n. 2, p. 85-91, Jun 2005.

RAMALHO-FERREIRA, G.; FAVERANI, L. P.; GROSSI-OLIVEIRA, G. A.; OKAMOTO, T. *et al.* Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **J Biomed Opt**, 20, n. 3, p. 038003, Mar 2015.

RAMALHO-FERREIRA, G.; FAVERANI, L. P.; MOMESSO, G. A. C.; LUVIZUTO, E. R. *et al.* Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. **Clin Oral Investig**, 21, n. 5, p. 1485-1494, Jun 2017.

RAMÍREZ, L.; LÓPEZ-PINTOR, R. M.; CASAÑAS, E.; ARRIBA, L. *et al.* New Non-Bisphosphonate Drugs that Produce Osteonecrosis of the Jaws. **Oral Health Prev Dent**, 13, n. 5, p. 385-393, 2015.

ROSSI, L.; LASCIO, S. D.; KOUROS, M.; PAGANI, O. A rare avascular osteonecrosis of the knee related to bisphosphonate treatment in a patient with metastatic breast cancer. **Breast Dis**, 35, n. 3, p. 203-206, 2015.

RUGGIERO, S. L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. **Ann N Y Acad Sci**, 1218, p. 38-46, Feb 2011.

RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B.; FANTASIA, J.; GOODDAY, R. *et al.* American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. **J Oral Maxillofac Surg**, 72, n. 10, p. 1938-1956, Oct 2014.

SAGLAM, E.; ALINCA, S. B.; CELIK, T. Z.; HACISALIHOGU, U. P. *et al.* Evaluation of the effect of topical and systemic ozone application in periodontitis: an experimental study in rats. **J Appl Oral Sci**, 28, p. e20190140, 2020.

SAITO, T.; STERBENZ, J. M.; MALAY, S.; ZHONG, L. *et al.* Effectiveness of anti-osteoporotic drugs to prevent secondary fragility fractures: systematic review and meta-analysis. **Osteoporos Int**, 28, n. 12, p. 3289-3300, Dec 2017.

SANTOS-SILVA, A. R.; BELIZÁRIO ROSA, G. A.; CASTRO JÚNIOR, G.; DIAS, R. B. *et al.* Osteonecrosis of the mandible associated with bevacizumab therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 115, n. 6, p. e32-36, Jun 2013.

SCHWARTZ, H. C. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update and CTX. **J Oral Maxillofac Surg**, 73, n. 3, p. 377, Mar 2015.

SHIRAKI, M.; TANAKA, S.; SUZUKI, H.; UEDA, S. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and changes in bone metabolism associated with zoledronic acid treatment in Japanese patients with primary osteoporosis. **J Bone Miner Metab**, 35, n. 6, p. 675-684, Nov 2017.

SIVALINGAM, V. P.; PANNEERSELVAM, E.; RAJA, K. V.; GOPI, G. Does Topical Ozone Therapy Improve Patient Comfort After Surgical Removal of Impacted Mandibular Third Molar?

- A Randomized Controlled Trial. **J Oral Maxillofac Surg**, 75, n. 1, p. 51.e51-51.e59, Jan 2017.
- SOARES, C. D.; MORAIS, T. M. L.; ARAÚJO, R.; MEYER, P. F. *et al.* Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats. **Growth Factors**, 37, n. 1-2, p. 95-103, Apr 2019.
- STAVROPOULOS, A.; BERTEL, K.; PIETSCHMANN, P.; PANDIS, N. *et al.* The effect of antiresorptive drugs on implant therapy: Systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Implants Res**, 29 Suppl 18, p. 54-92, Oct 2018.
- STUBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. **Quintessence Int**, 37, n. 5, p. 353-359, May 2006.
- STÜBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: A review. **Quintessence Int**, 37, n. 5, p. 353-359, 2006.
- SÖZEN, T.; ÖZİŞİK, L.; BAŞARAN, N. An overview and management of osteoporosis. **Eur J Rheumatol**, 4, n. 1, p. 46-56, Mar 2017.
- TARANTINO, U.; CEROCCHI, I.; SCIALDONI, A.; SATURNINO, L. *et al.* Bone healing and osteoporosis. **Aging Clin Exp Res**, 23, n. 2 Suppl, p. 62-64, Apr 2011.
- TOKER H. ÖZDEMİR H., K. E.; H., Ö. The Effects of Allograft Combined with Ozone Therapy on Regeneration of Calvarial Defects in Rats. **J Periodontal Res**.19: 205-213 p. 2016;.
- TOROYAN, T.; PEDEN, M. M.; IAYCH, K. WHO launches second global status report on road safety. **Inj Prev**, 19, n. 2, p. 150, Apr 2013.
- TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; BERNINI, P.; NEPI, S. *et al.* Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. **Int J Toxicol**, 29, n. 2, p. 165-174, Mar-Apr 2010.
- TURKER, M.; ASLAN, A.; CIRPAR, M.; KOCHAI, A. *et al.* Histological and biomechanical effects of zoledronate on fracture healing in an osteoporotic rat tibia model. **Eklemler Hastalıkları Cerrahisi**, 27, n. 1, p. 9-15, 2016.
- WATTS, N. B.; DORE, R. K.; BAIM, S.; MITLAK, B. *et al.* Forearm bone mineral density and fracture incidence in postmenopausal women with osteoporosis: results from the ACTIVEExtend phase 3 trial. **Osteoporos Int**, 32, n. 1, p. 55-61, Jan 2021.
- WRONSKI, T. J.; WALSH, C. C.; IGNASZEWSKI, L. A. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Bone**, 7, n. 2, p. 119-123, 1986.
- YANG, H.; PAN, H.; YU, F.; CHEN, K. *et al.* A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. **Int J Clin Exp Pathol**, 8, n. 5, p. 5161-5167, 2015.
- YOON, B. H.; LEE, Y. K.; KIM, S. C.; KIM, S. H. *et al.* Epidemiology of proximal femoral fractures in South Korea. **Arch Osteoporos**, 8, p. 157, 2013.
- ZHANG, J.; GUAN, M.; XIE, C.; LUO, X. *et al.* Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. **Oxid Med Cell Longev**, 2014, p. 273475, 2014.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação da ozonioterapia na otimização do reparo ósseo na fixação de fraturas em ratas osteoporóticas tratadas com zolendronato", Processo FOA nº 00405-2019, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 10 de Maio de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Junho de 2021.

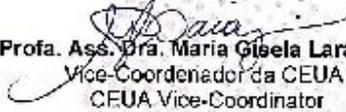
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Julho de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Ozone therapy assessment in bone fixation optimization in fixation of fractures in osteoporotic rats treated with zoledronate", Protocol FOA nº 00405-2019, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 10, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 02, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 02, 2021.


Prof. Ass. Dra. Maria Cibela Laranjeira
Vice-Coordenador da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1153 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 E-mail: CEUA.ousu@fca.unesp.br

ANEXO B – Normas do periódico de interesse para publicação: BONE

Link dos “guidelines”:

<https://www.elsevier.com/journals/bone/8756-3282/guide-for-authors>



BONE

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 8756-3282

DESCRIPTION

BONE is an interdisciplinary forum for the rapid publication of original articles and reviews on basic, translational, and clinical aspects of bone and mineral metabolism. The Journal also encourages submissions related to interactions of bone with other organ systems, including cartilage, endocrine, muscle, fat, neural, vascular, gastrointestinal, hematopoietic, and immune systems. Particular attention is placed on the application of experimental studies to clinical practice.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting (“Public Access”) policy

BONE and Elsevier facilitate the author’s response to the NIH Public Access Policy. For more details please see the [Guide for authors](#). Original research articles and case reports can also be submitted to *BONE*’s open access companion title, *Bone Reports*.

AUDIENCE

Bone Specialists, Orthopedists, Oncologists, Radiologists, Endocrinologists, Gynecologists, Rheumatologists, Cell and Molecular Biologists

IMPACT FACTOR

2019: 4.147 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents
Elsevier BIOBASE
BIOSIS Citation Index
PubMed/Medline
Embase
Pascal Francis
Reference Update
Bioengineering Abstracts