

MARIA ELOISE DE SÁ SIMON

**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
2023



MARIA ELOISE DE SÁ SIMON

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

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a graduação no curso de Odontologia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba
2023

*A Deus, meu condutor, aos meus pais, Altair
Simon e Cléia Antonuci de Sá Simon, que
tornaram este sonho possível e, ao meu noivo,
Lucas Barreto Moura, meu companheiro de vida e
maior incentivador.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sua infinita bondade, por me guiar dia após dia no melhor caminho e por me presentear diariamente com bençãos muito além do que a minha mente seria capaz de sonhar.

Aos meus pais, **Cléia Antonuci de Sá Simon** e **Altair Simon**, por me criarem e educarem com tanto amor, por sonharem este sonho comigo, sempre me apoiando e inúmeras vezes abrindo mão de desejos pessoais em benefício de me dar condições para esta formação; e ao meu irmão **Matheus de Sá Simon**, por ser meu cúmplice e amigo desde o início da minha vida; é um privilégio imensurável chamá-los de família.

Ao meu noivo, **Lucas Barreto Moura**, por escolher caminhar ao meu lado nesta aventura incrível que é a vida, por me apoiar, encorajar e sonhar comigo os meus maiores sonhos.

Aos meus **avós** maternos, Maria de Fátima Antonuci de Sá e Antônio Cardoso de Sá, e paternos, Maria Aparecida Quesi Simon e Natal Simon (*in memoriam*) por formarem a base da minha família, por apoiarem, torcerem e se orgulharem de cada passo que pude dar.

A minha **família e amigos**, que sempre estiveram comigo apoiando cada passo dado e sonhando junto a mim com os passos futuros.

Ao meu orientador, **Professor Associado Doutor Leonardo Perez Faverani**, o querido “Prof. Léo”, o qual tive o prazer de ser orientada durante quatro anos e meio, anos estes de um aprendizado imensurável e muitas conquistas profissionais. Sob sua orientação realizei meu grande sonho de ser contemplada com minha primeira bolsa de iniciação científica concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo: 2019/19445-9), estudo que se materializou neste trabalho de conclusão de curso, seguido de outros trabalhos (PIBITI – Proposta: 3258/Edital: 3/2021 e FAPESP – Processo: 2021/12845-1) os quais foram motivo de grande realização profissional e pessoal. Gostaria de enfatizar aqui a minha eterna gratidão e admiração a este ser humano ímpar, que tem visível prazer em ajudar e faz a diferença na vida de cada um que cruza seu caminho; sou extremamente grata por desde o início acreditar em mim e me receber tão bem em seu grupo de pesquisa, onde pude desenvolver grande parte da profissional que desejo ser.

Ao **Professor Assistente Doutor Paulo Roberto Botacin**, um dos primeiros professores que tive o prazer de conhecer nesta faculdade, por ter acreditado no meu potencial e me orientado em minha primeira monitoria; guardarei para sempre uma enorme admiração e carinho pelo ser humano e excelente professor que é.

À **Professora Titular Sandra Helena Penha de Oliveira**, por ter sido a minha “mãe na ciência”, a responsável por me receber em seu laboratório sendo eu ainda uma aluna do ensino médio de 15 anos, e me orientar em meu primeiro contato com a ciência através do programa PIBIC Jr. Sempre guardarei comigo o seu carinho em me explicar toda a pesquisa em que fui inserida, algo tão distante da vivência de um aluno de ensino médio, e evidencio aqui a minha grande admiração pela sua garra e inteligência.

À **Stéfany Barbosa**, mestre e doutoranda em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (CTBMF) a qual tive o prazer de acompanhar grande parte da trajetória acadêmica. Sou grata pela sua grande disposição em ensinar e ajudar e, não tenho dúvidas de que coisas incríveis te aguardam em um futuro muito próximo, frutos da sua própria dedicação.

A **todo o grupo de pesquisa, o “Faverani’s Team”**, orientado pelo professor Leonardo Faverani, que me auxiliou no desenvolvimento das pesquisas as quais eu estive vinculada, em grande parte do meu desenvolvimento como acadêmica, e me levou a um contato mais próximo com a área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, tão amada por mim. Desejo a todos grande sucesso e realizações.

Aos meus **amigos de faculdade**, companheiros de caminhada que tornaram os dias mais leves e foram como irmãos no dia a dia ao longo destes anos, em especial à Duda Cabrerizo, Matheus Morcela, Gustavo Nilo e Gabriel Turci, meus amigos desde o primeiro ano, que choraram e riram comigo infinitas vezes, sempre permanecendo unidos; e aos meus amigos de Iniciação Científica: Gabriela Baccaro, Mileni Buzo, Monique Gonçalves, Nathalia Pereira, Victor Sachi e Gustavo Ribeiro, que foram parceiros para todos os momentos, desde as limpezas de biotério até os almoços de domingo; vocês estarão para sempre comigo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da minha primeira bolsa de iniciação científica

(processo: 2019/19445-9) mesmo em meio à pandemia de COVID-22, me aproximando ainda mais da área acadêmica e me incentivando a permanecer focada em meus objetivos ainda que estivesse longe das aulas presenciais e clínicas; e também pela minha terceira bolsa de iniciação científica (processo: 2021/12845-1) que me permitiu aperfeiçoar e enriquecer minha experiência na área e que, financeiramente, foram de grande importância para a minha manutenção no curso .

Ao **Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – PIBITI**, pela concessão da minha segunda bolsa de iniciação científica (Proposta: 3258/Edital: 3/2021) que me possibilitou grande enriquecimento profissional em uma nova linha de pesquisa.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA**, que foi meu grande sonho e hoje posso chamar de casa, o lugar que me abrigou e me forjou como a profissional que desejo ser; sinto enorme orgulho em fazer parte da história dessa instituição que ao longo de sua vasta história formou tantos nomes emblemáticos e profissionais de excelência. Sou imensamente grata a toda a estrutura e ensinamentos que nesta instituição me foram oferecidos; a cada professor, funcionário e servidor, minha eterna gratidão!

“As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não subiram ao coração do homem, são as que Deus preparou para os que o amam.”

II Coríntios 2:9

SIMON, M. E. S. **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.** 2023. 77 f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

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, 60 ratas Wistar, fêmeas, com 6 meses de idade, foram submetidas à ovariectomia bilateral (Ovx). Após três meses, quatro 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) e, no grupo SAL foi administrado 0,45 ml de solução salina usando o mesmo protocolo do ZOL. Após três meses desta terapia, quatro animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para caracterização da arquitetura óssea (Micro-ct) e os animais restantes foram novamente divididos, aleatoriamente, de forma que os animais do grupo ZOL foram subdivididos em ZOL (n=12) e ZOL+OZN (n=12) e, os animais dos grupos SAL foram subdivididos em SAL (n=12) e SAL+OZN (n=12). Após isto, foi iniciada a ozonioterapia na concentração de 0,7mg/kg a cada dois dias até o final do experimento. Ao fim de 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 do corpo da mandíbula, da cabeça do fêmur e das vértebras. Uma parte das peças correspondentes ao colo femoral foi destinada a testes biomecânicos e outra parte, para inclusão em resina fotopolimerizável para obtenção de lâminas e análise em microscópio confocal à laser. As demais amostras coletadas da cabeça do fêmur, das mandíbulas e vértebras foram descalcificadas e, através delas, realizadas lâminas histológicas, as quais foram coradas em hematoxilina e eosina para a análise histométrica (área de osso neoformado), contagem de células inflamatórias (linfócitos) e contagem de osteócitos. Para os parâmetros quantitativos de porcentagem de tecido ósseo na região da cabeça do fêmur e da 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 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 do fêmur e 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 ($p < 0,05$). A área de calceína dos grupos tratados com ácido zoledrônico (ZOL e ZOL+OZN) foi maior que os grupos SAL e SAL+OZN ($p > 0,05$), assim como em relação à alizarina, em que os resultados foram maiores nos grupos SAL+OZN e ZOL+OZN quando comparados aos grupos SAL e ZOL ($p > 0,05$). Este estudo *in vivo* mostrou que existe um efeito sinérgico entre o ozônio e o ácido zoledrônico que promoveu a manutenção da massa óssea e formação de tecido ósseo vital em ratas ovariectomizadas. Além disso, indicou que a terapia com ozônio foi segura no modelo experimental proposto nesta investigação.

Palavras-chave: Osteoporose, regeneração óssea, ozônio

SIMON, M. E. S. **Dynamic analysis of mandibular bone tissue, femoral neck and spine of rats with induced osteoporosis treated with zoledronic acid and systemic administration of ozone.** 2023. 77 f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

This work aimed to analyze the potential of ozone therapy in the dynamics of bone tissue in ovariectomized rats treated with zoledronic acid. For this purpose, 60 female Wistar rats, 6 months old, underwent bilateral ovariectomy (Ovx). After three months, four animals were submitted to euthanasia for characterization of bone tissue architecture in microtomography (Micro-ct), the remaining animals were divided into two groups, the ZOL group and the SAL group, and the treatment was started with zoledronic acid (100 µg/Kg/28 days) in the ZOL group animals and, 0.45 ml of saline solution was administered using the same ZOL protocol in the SAL group animals. After three months of this therapy, four animals from each group were euthanized to characterize the bone architecture (Micro-ct) and the remaining animals were randomly divided again, so that the animals in the ZOL group were subdivided into ZOL (n= 12) and ZOL+OZN (n=12) and, the animals from the SAL groups were subdivided into SAL (n=12) and SAL+OZN (n=12). After that, ozone therapy was started at a concentration of 0.7mg/kg every two days until the end of the experiment. At the end of 30 and 60 days from the start of ozone therapy, six animals from each group were euthanized for analysis and bone structural characterization of the mandible, femoral head and spine regions. A part of the pieces corresponding to the femoral neck was destined for biomechanical tests and another part, for inclusion in photopolymerizable resin to obtain slides and analysis in laser confocal microscope. The other samples collected from the femoral neck, mandibles and vertebral columns were decalcified and, through them, histological slides stained in hematoxylin and eosin were made for histometric analysis (area of newly formed bone), inflammatory cell count (lymphocytes) and blood cell count. For the quantitative parameters of percentage of bone tissue in the region of the femoral head and mandible, the ANOVA-2-way test (groups vs analysis periods) was applied, followed by the Tukey post-test, when $p < 0.05$. As for 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 greater percentage of bone volume, a greater number of osteocytes and a greater number of inflammatory cells in the region of the femoral head and mandible, 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 ($p < 0.05$). The calcein area of the groups treated with zoledronic acid (ZOL and ZOL+OZN) was greater than the SAL and SAL+OZN groups ($p > 0.05$), as well as in relation to alizarin, in which the results were greater in the groups SAL+OZN and ZOL+OZN when compared to the SAL and ZOL groups ($p > 0.05$). This *in vivo* study showed that there is a synergistic effect between ozone and zoledronic acid promoting maintenance of bone mass and formation of vital bone tissue in ovariectomized rats. Furthermore, showed that ozone therapy was safe in the experimental model proposed in this investigation.

Keywords: Osteoporosis, bone regeneration, ozone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. (A) Incisão nos flancos das ratas. (B) Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos. (C) Acesso ao peritônio. (D) Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal. (E) Localização do ovário e chifre uterino. (F) Laqueadura do chifre uterino. (G) Ovário removido. (H) Reposição dos tecidos laqueados. (I) Sutura dos planos internos. (J) Sutura do plano superficial. 25

FIGURA 2 - Linha do tempo representando os períodos cirúrgicos, os grupos de estudo e as modalidades de tratamento. 27

FIGURA 3 - Linha do tempo que representa a terapia medicamentosa com zoledronato e terapia medicamentosa com ozônio. 27

FIGURA 4 - Aplicação de Zoledronato via intraperitoneal em ratas. 28

FIGURA 5 - Fotos sequenciais da aquisição do ozônio e em seguida aplicação do ozônio nas ratas. 29

FIGURA 6 - 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. 38

FIGURA 7 - Representação gráfica da microtomografia da região de cabeça femoral dos animais da caracterização, observa-se diferenças estatisticamente significativas 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. 39

FIGURA 8 – Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de colo 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. Escala aplicada 100µm. 41

FIGURA 9 - 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). 42

FIGURA 10 – 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. 43

FIGURA 11 – 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. 44

FIGURA 12 – 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. Escala aplicada 100µm. 45

FIGURA 13 - 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). 46

FIGURA 14 - 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. Escala aplicada 25µm. 48

FIGURA 15 - 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. 49

FIGURA 16 – 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. 50

FIGURA 17 - 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. 51

FIGURA 18 – 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. Escala aplicada 25µm. 52

FIGURA 19 – 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 20 – 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. Escala aplicada 25µm. 54

FIGURA 21 - 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. 55

FIGURA 22 – 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. 56

FIGURA 23 – 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. 57

FIGURA 24 - 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. Escala aplicada 25µm. 58

FIGURA 25 - 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. 59

FIGURA 26 - 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 (&, *). 60

FIGURA 27 - 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 significativa entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (\$, £). 60

FIGURA 28 - Fotos representativas da área de tecido ósseo de colo de fêmur em microscopia confocal a laser, evidenciando a presença dos fluorocromos calceína (a,b,c,d) e alizarina (e,f,g,h). Os grupos representados são SAL (a,e), ZOL (b,f), SAL+OZN (c,g) e ZOL+OZN (d,h). Observa-se maior marcação da calceína nos grupos tratados com ácido zoledrônico (ZOL e ZOL+OZN) quando comparados aos grupos não tratados (SAL e SAL+OZN), enquanto na alizarina observa-se maior marcação nos grupos não tratados com zoledronato (SAL e SAL+OZN) quando comparados aos grupos tratados (ZOL e ZOL+OZN). Escala aplicada 25µm. 62

FIGURA 29 - Gráfico representativo da área de Fluorocromos (pixels²) em colo de fêmur das ratas referente aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN no período de 60 dias. Quanto à calceína (verde), observou-se resultados

estatisticamente significativos na comparação entre os grupos SAL+OZN e ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL. Sobre a alizarina (vermelho), também foram observados resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos SAL+OZN e ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2. OBJETIVOS.....	22
3. METODOLOGIA	23
3.1 Delineamento Experimental	23
3.1.1 Ovariectomia bilateral	24
3.1.2 Grupos experimentais	25
3.1.3 Protocolo medicamentoso: Zoledronato	27
3.1.4 Protocolo para aplicação de Ozônio.....	29
3.2 Eutanásia e Obtenção das amostras	29
3.3 Análises.....	30
3.3.1 Análises dos tecidos calcificados	30
3.3.1 Análise dos tecidos descalcificados	33
3.3.3 Análise estatística dos dados.....	36
4. RESULTADOS.....	36
4.1 Caracterização da microarquitetura óssea	37
4.2 Análise histológica.....	39
4.2.1 Área de tecido ósseo nas regiões de cabeça femoral, coluna vertebral e mandíbula40	
4.2.2 Tecido ósseo vital	46
4.2.3 Contagem de células inflamatórias	52
4.3 Análise biomecânica.....	58
4.3.1 Análise biomecânica em colo de fêmur	58
4.4 Análise de fluorocromos em microscopia confocal a laser.....	60
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÃO	67
7. REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	77
Anexo I – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.	77

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A busca por uma melhor qualidade de vida é um assunto que cada vez mais vem ganhando notoriedade devido ao aumento da expectativa de vida atual. Entretanto, as alterações fisiológicas decorrentes do envelhecimento trazem um grande desafio para reabilitações e tratamentos, principalmente as relacionadas ao tecido ósseo¹⁻³.

Dentre as alterações do tecido ósseo, podemos destacar um grande exemplo como a osteoporose por estar relacionada pela diminuição na qualidade do tecido ósseo sistemicamente, que pode afetar indivíduos de ambos os sexos, sendo mais comum em mulheres, especialmente na pós-menopausa⁴. Além disso, fatores como o uso crônico de bisfosfonatos, outras drogas antirreabsortivas e anti angiogênese utilizadas para tratamento de tumores malignos ou da própria osteoporose, podem interferir sistemicamente, retardando o dinamismo ósseo independentemente das alterações na arquitetura óssea observadas no paciente idoso⁵⁻¹⁰.

O processo de reabsorção, seguido da deposição óssea é denominado de remodelação acoplada ou turnover ósseo, que deve ser mantida de forma equilibrada durante toda a vida, seja em condições normais de estresse ou nas alterações traumáticas¹¹. Atentando a essa problemática, uma das desordens mais comuns nos indivíduos após os 50 anos de idade são as fraturas dos ossos acometidos pela osteoporose¹².

A osteoporose é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como “uma doença esquelética sistêmica caracterizada por redução da massa óssea e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade a fratura” (OMS,1983). Mesmo não estando diretamente relacionada com o prejuízo no reparo das fraturas, essa alteração sistêmica é um dos fatores que se relacionam com um maior número de complicações em toda a literatura científica⁸⁻¹³.

Nesta doença, osteoclastos e osteoblastos tem suas funções alteradas pela modulação dos hormônios sexuais, estresse, atividade física e idade,

levando a uma reabsorção óssea exacerbada por parte dos osteoclastos, superando a produção óssea pelos osteoblastos, o que resulta em uma diminuição geral da massa óssea e, conseqüentemente, da resistência óssea. Sendo assim, por conta da redução significativa do fornecimento de estrógeno, as mulheres no período pós-menopausa são as principais afetadas pela doença¹⁴.

Os bisfosfonatos são usualmente administrados no tratamento de lesões cancerígenas associadas ao tecido ósseo e a metástase, porém também são utilizados no manejo da osteoporose¹⁵. Desse modo, atuam inibindo a ação dos osteoclastos, conseqüentemente diminuindo a reabsorção óssea e assim interferindo drasticamente na dinâmica óssea¹⁶. Entretanto, essa interferência no metabolismo pode levar a osteonecrose dos maxilares, que é uma terrível condição reportada por pacientes submetidos a terapia com estes medicamentos, associada ao retardo no reparo ósseo, infecção e necrose óssea, o que afeta diretamente a vida dos pacientes, podendo levar a casos de morbidade severa^{17,18}.

São cada vez mais estudadas terapias adjuvantes capazes de gerar maior conforto e melhorar a dinâmica do tecido ósseo do paciente, deste modo, diminuindo a reabsorção óssea. Dentre elas, a terapia com ozônio é uma modalidade proposta e que necessita de comprovação. O ozônio é uma forma alotrópica do oxigênio com um peso molecular de 47,98 g/mol, composto altamente instável que se desintegra formando oxigênio¹⁹. Desde o desenvolvimento da terapia medicinal com ozônio, ela tem sido utilizada para várias aplicações clínicas específicas, como a atividade microbicida²⁰, promoção da vascularização²¹ e imunoestimulação²². O ozônio pode ser administrado por via parenteral ou tópica e é encontrado em diversas formas, tais como: gás, soluções e gel²³.

A ozonioterapia está associada a melhora da microcirculação, circulação periférica e metabolismo geral. Sendo assim, o ozônio atua melhorando o transporte de oxigênio para os tecidos, regulando as enzimas antioxidantes e modulando as respostas do sistema imune do paciente, estimulando a formação de fibroblastos, aumentando a liberação de fatores de crescimento das plaquetas

e acelerando a troca de prótons e elétrons após a dissolução no plasma, consequentemente levando a melhora do metabolismo do corpo todo^{24,25}.

A literatura, através de estudos histológicos e histométricos em modelos animais vem demonstrando que a ozonioterapia é uma nova estratégia terapêutica que pode estimular reparo ósseo, entretanto, novos estudos devem ser realizados de modo a melhorar a previsibilidade do tratamento^{26,27}. Estudos clínicos realizados após exodontias e tratamento de necrose associada a bifosfonatos, utilizando o ozônio para melhora na cicatrização mostraram que a ozonioterapia melhora a proliferação celular e estimula a cicatrização dos tecidos moles^{17, 23, 28}, entretanto o mecanismo fisiopatológico ainda não é um consenso na literatura.

Por conta disso, o Conselho Federal de Medicina (CFM) emitiu uma resolução 2.181 de abril de 2018²⁹, em que a terapia com ozônio é classificada como procedimento experimental e só pode ser usado em procedimentos clínicos dentro dos protocolos do sistema CEP-Conep. Portanto, as pesquisas pré-clínicas (“in vivo”) deveriam ser realizadas para a compreensão das propriedades alcançadas e assim, os protocolos de uso clínico possam ser estabelecidos.

Levando em conta o mecanismo de ação dos bisfosfonatos e do ozônio, é possível supor que a combinação dos dois possa levar a uma melhora na dinâmica do tecido ósseo e a uma possível redução nas doses de bisfosfonatos, pois o ozônio como um bioestimulador pode melhorar a resposta deste tecido. Essa hipótese pode resultar em menos complicações associadas ao uso de bifosfonatos, em função das compensações pela ozonioterapia.

A utilização de ossos com densidade reduzida, caracterizada por osteoporose experimental, mostra-se um modelo interessante para avaliação do ozônio e dos bisfosfonatos, tanto para avaliar a atuação do ozônio para uma possível melhora na dinâmica óssea, sua comparação com os bisfosfonatos e o possível uso em conjunto das duas terapias onde o mecanismo fisiopatológico do ozônio e uma possível sinergia entre ele e o os bisfosfonatos poderá ser evidenciada, sugerindo uma diminuição na dose dos bisfosfonatos³⁰. Observa-

se também o ineditismo dessa pesquisa, em que diante do nosso conhecimento, publicações similares não foram encontradas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho se propôs a analisar a ozonioterapia na dinâmica do tecido ósseo em ratas submetidas à indução de osteoporose através da ovariectomia bilateral, tratadas ou não com um bisfosfonato (zoledronato) e avaliar se o uso em conjunto melhora o turnover ósseo.

A hipótese nula desta pesquisa foi que independente do modelo experimental (OZN e ZOL) a terapia não influenciará na dinâmica do tecido ósseo (turnover) dos grupos a serem analisados.

3. METODOLOGIA

Para a presente pesquisa, que buscou analisar a ozonioterapia na dinâmica do tecido ósseo em ratas submetidas à indução de osteoporose, tratadas ou não com um bisfosfonato (zoledronato-ZOL) e avaliar se o uso em conjunto melhora o “turnover ósseo”, inicialmente foi necessária a ambientação dos animais, realização da cirurgia de ovariectomia, após três meses foi realizada a avaliação da micro arquitetura óssea por meio da microtomografia computadorizada e em seguida foi dado início a terapia medicamentosa. Para tanto, o protocolo medicamentoso adotado para o Zoledronato foi de 100µg/Kg a cada quatro dias a partir do terceiro mês após ovariectomia enquanto o tratamento com ozônio se iniciou após três meses do início da terapia com o Zoledronato na concentração de 0,7mg/kg, utilizando o aparelho fornecido pela empresa OZONE&LIFE INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SISTEMAS LTDA.

3.1 Delineamento Experimental

Foram utilizadas 60 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus* – Wistar), com 6 meses de idade e peso corporal compreendido entre 200 – 250 g, de uma cepa que foi mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, e foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”³¹.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Para tanto, o projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP através do número do parecer consubstanciado 00405-2019. (Anexo 1)

O número de animais por grupo foi determinado a partir do cálculo do Poder do Teste no Software estatístico Sigma Plot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis, San Jose, CA, EUA) de acordo com dados de publicação prévia

(Erdemci et al. 2014)* em que a partir dos valores de diferença de média para dois grupos = 0,17; desvio padrão = 0,07, considerando o poder do teste de 0,8 e alfa de 5%, para o estudo em ratas necessitaria 5 amostras por grupo experimental.

Sample Size for t-test:

quinta-feira, setembro 17, 2020, 12:56:07

Data source: Data 1 in Notebook1

Sample Size	4
Difference in Means	0.170
Standard Deviation	0.0700
Power	0.800
Alpha	0.0500

*ERDEMCI, F.; GUNAYDIN, Y.; SENCIMEN, M.; BASSORGUN, I.; OZLER, M.; OTER, S.; GULSES, A.; GUNAL, A.; SEZGIN, S.; BAYAR, G.R.. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 777-783, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2013.12.007>.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, 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 (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A.– Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos.

Após um período de adaptação, todos os animais foram submetidos ao procedimento de ovariectomia bilateral.

3.1.1 Ovariectomia bilateral

Nos primeiros oito dias, após a ambientalização, que corresponde a 2 ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio), as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal, de acordo com técnica descrita em estudos prévios³³⁻³⁶. A obtenção de células epiteliais através do esfregaço, foram dispostas em lâminas histológicas e analisadas em microscópio óptico. Com isso, durante os oito dias,

a regularidade do ciclo estral foi avaliada. Os animais que não tiveram a regularidade entre as fases estrais (proestro, estro, metaestro e diestro) foram desconsiderados do estudo.

Após esta fase da pesquisa, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral (grupo OVX)³⁷⁻⁴¹. Inicialmente, estas foram anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) na dose de 5 mg/kg e Cloridrato de quetamina (Ketamina, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) na dose de 50mg/kg e, a seguir foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral, foi realizada uma incisão de 1,5 cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, os ovários e os chifres uterinos foram localizados e laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Após isso, foi feita a remoção dos ovários. Finalizado, foi feita a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (Figura 1).

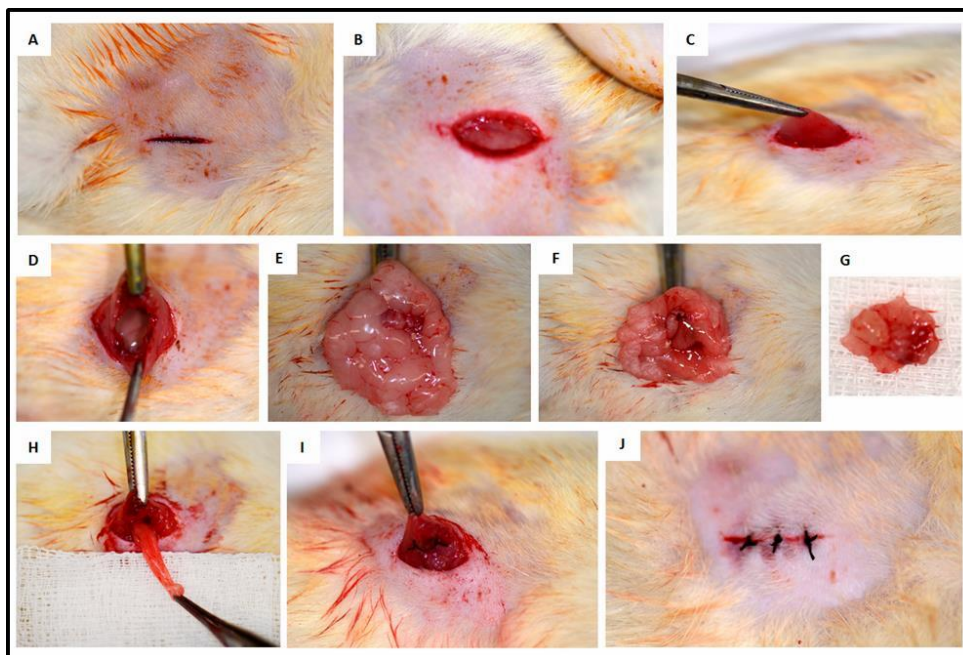


Figura 1 – Etapas cirúrgicas do procedimento cirúrgico de ovariectomia. (A) Incisão nos flancos das ratas. (B) Divulsão dos planos anatômicos subcutâneos. (C) Acesso ao peritônio. (D) Incisão do peritônio e acesso a cavidade abdominal. (E) Localização do ovário e chifre uterino. (F) Laqueadura do chifre uterino. (G) Ovário removido. (H) Reposição dos tecidos laqueados. (I) Sutura dos planos internos. (J) Sutura do plano superficial.

3.1.2 Grupos experimentais

Do total de 60 animais designados ao estudo, após três meses da ovariectomia, quatro foram submetidos à eutanásia para avaliação da microarquitetura óssea (microtomografia) seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado^{11,12}.

Neste momento os animais foram divididos em grupo SAL e ZOL e foi iniciado o protocolo medicamentoso com aplicação de zoledronato, 100 µg/Kg, aplicado a cada 28 dias, o qual foi diluído em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (Sigma Chemical®, St Louis, MO, EUA).

No Grupo SAL, foi administrado 0,45 ml de solução salina pura usando o mesmo protocolo de tempo das aplicações da medicação do zoledronato.

Após três meses do início da terapia medicamentosa com zoledronato, quatro animais do grupo ZOL e quatro animais do grupo SAL foram submetidos à eutanásia para avaliação da microarquitetura óssea (microtomografia) seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado^{11,12}.

Ainda após três meses do início do tratamento com zoledronato e seis meses após a ovariectomia, os 48 animais restantes foram novamente divididos, sendo os 24 animais presentes no grupo ZOL subdivididos em grupos ZOL+SAL (n=12) e ZOL+OZN (n=12), e dos 24 presentes no grupo SAL, subdivididos em SAL (n=12) e SAL+OZN (n=12).

Desta forma, neste mesmo momento, a ozonioterapia foi iniciada nos animais dos grupos ZOL+OZN e SAL+OZN na concentração de 0,7mg/kg de dois em dois dias, até o final do experimento, utilizando o aparelho fornecido pela empresa OZONE&LIFE INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SISTEMAS LTDA (São José dos Campos – SP).

Nos grupos SAL, SAL + ZOL, SAL + OZN, a aplicação da solução salina teve como objetivo a simulação do mesmo nível de estresse do grupo teste que teve duas aplicações (grupo ZOL + OZN).

Ao sétimo e oitavo mês após a ovariectomia, a eutanásia de seis animais de cada grupo foi realizada para prosseguir com as análises propostas (Figuras 2 e 3).

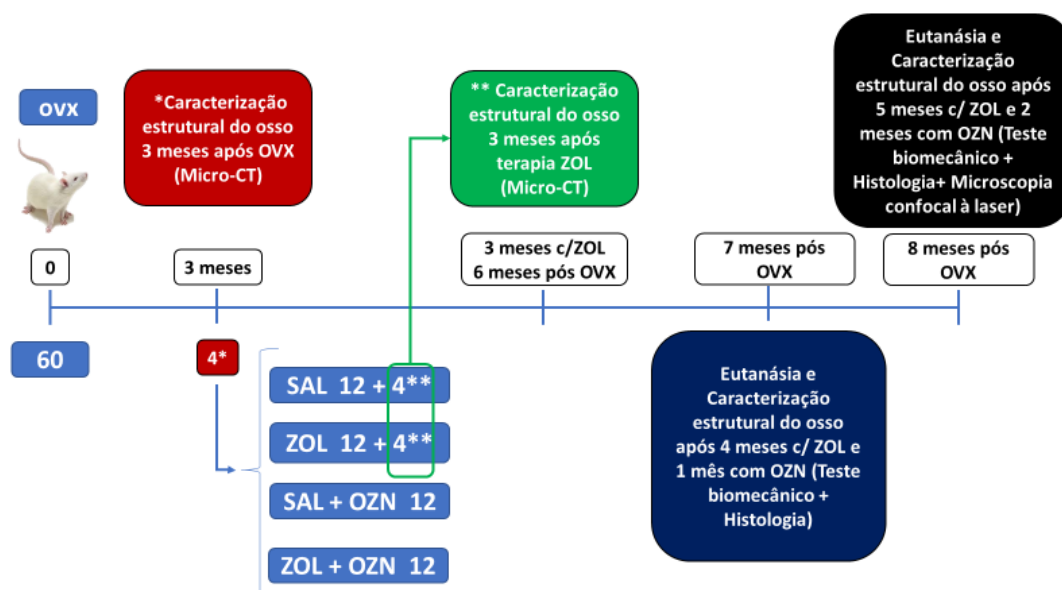


Figura 2: Linha do tempo representando os períodos cirúrgicos, os grupos de estudo e as modalidades de tratamento.

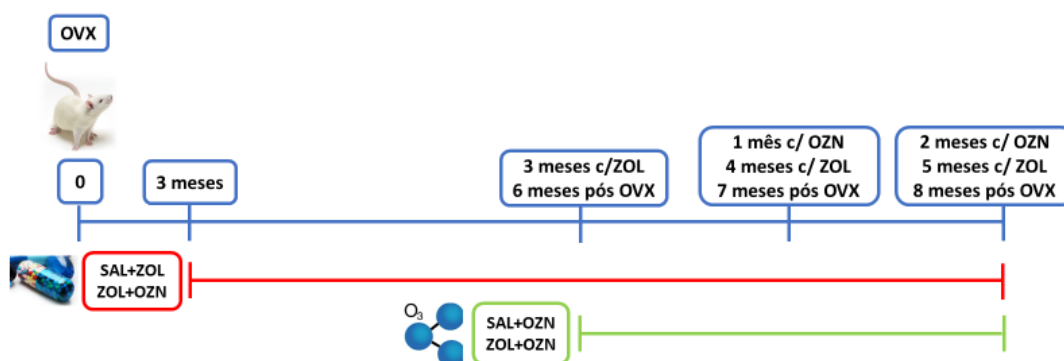


Figura 3: Linha do tempo que representa a terapia medicamentosa com zoledronato e terapia medicamentosa com ozônio.

3.1.3 Protocolo medicamentoso: Zoledronato

A literatura apresenta de forma bem estabelecida o protocolo medicamentoso quando se refere ao uso do zoledronato na dosagem oncológica em humanos, 4 mg deste fármaco a cada três ou quatro semanas^{36,37}. Deste modo, trabalhos experimentais envolvendo a administração de zoledronato em

ratos para mimetizar o tratamento oncológico, empregam uma dose de 200µg/Kg a 300µg/Kg, fracionada ou não ao longo de uma semana, por um período de quatro a doze semanas³⁷⁻⁴⁸. Sendo assim, estudos foram publicados⁴⁹⁻⁵¹ considerando o tempo de vida médio do rato, o peso e a superfície corporal da espécie utilizada, ratas *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, fez-se a opção por dividir a dose ao longo de uma semana, administrando 100µg/Kg a cada quatro dias, o que permite a manutenção de um nível mais constante de absorção.

O tratamento medicamentoso com zoledronato utilizado para tratar a osteoporose em humanos é feito através da aplicação IV de 5 mg da medicação em dose única anualmente^{52,53}. Esta dosagem corresponde a 10% daquela utilizada no protocolo medicamentoso oncológico com a mesma medicação. Deste modo, os mesmos parâmetros usados para adequação de dose avaliando tempo de vida médio do animal, o peso e a superfície corporal da espécie utilizada, ratas *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, a dose estabelecida foi de 100µg/Kg a cada 28 dias, esta posologia é semelhante aos estudos prévios⁵³⁻⁵⁸.

O plano de tratamento medicamentoso teve duração de cinco meses e a administração de veículo ou zoledronato (Sigma Chemical®, St Louis, MO, EUA) para todos os grupos ocorreu pela via intraperitoneal, obedecendo um intervalo de 28 dias entre as injeções. A dose de zoledronato foi de 100 µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%. Tal dose e o plano de tratamento medicamentoso consistiu em uma adaptação para o rato do protocolo empregado atualmente para a terapia da osteoporose em humanos^{35,36}.



Figura 4: Aplicação de Zoledronato via intraperitoneal em ratas.

3.1.4 Protocolo para aplicação de Ozônio

Este protocolo foi aplicado nos grupos SAL+OZN (n=6) e ZOL +OZN (n=6). 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 realizada aplicação via intraperitoneal do ozônio em concentração de 0,7mg/kg em uma seringa descartável de 30 ml com agulha de calibre 25mm x 0,07mm, nos períodos: no pós operatório imediato e 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º, 14º, 16º, 18º, 20º, 22º, 24º, 26º, 28º, 30º, 32º, 34º, 36º, 38º, 40º, 42º, 44º, 46º, 48º, 50º, 52º, 54º, 56º, 58º, 60º dia pós-operatório ^{36,37} (Figura 5-A,B).

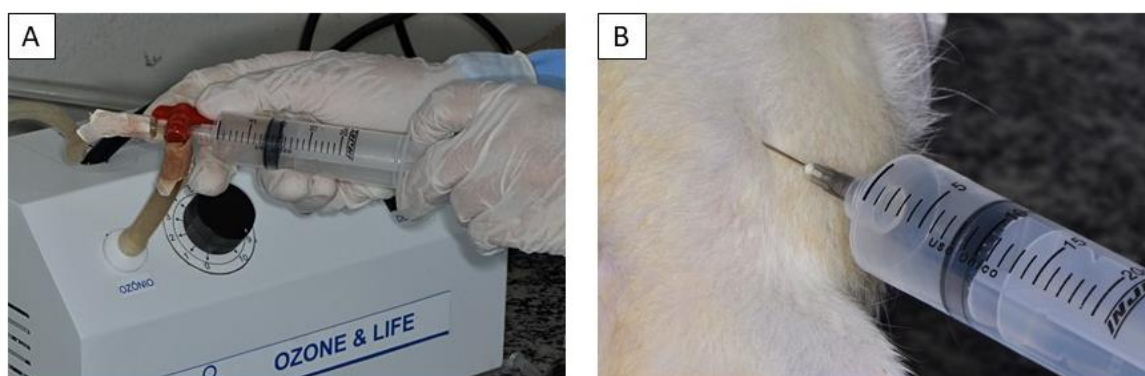


Figura 5(A,B): Fotos sequenciais da aquisição do ozônio e em seguida aplicação do ozônio nas ratas.

3.2 Eutanásia e Obtenção das amostras

A eutanásia foi realizada em dois períodos 30 e 60 dias após o início da terapia com ozônio, para eutanásia em todos os grupos e momentos da pesquisa, os animais foram anestesiados, nas mesmas doses e utilizando os mesmos anestésicos descritos anteriormente e, se 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.

3.3 Análises

3.3.1 Análises dos tecidos calcificados

Avaliação da micro arquitetura óssea

Três meses após a ovariectomia bilateral, quatro animais foram escolhidos de forma aleatória para a eutanásia e avaliação da citoarquitetura óssea. Após esta caracterização foi iniciado o protocolo com zoledronato e, após três meses, quatro animais dos grupos (SAL e ZOL) foram submetidos à eutanásia para também caracterizar a citoarquitetura óssea.

A análise foi realizada usando a micro tomografia computadorizada (micro-ct), para tanto, seguindo os parâmetros volumétricos sugeridos pela Academia Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado^{3,32}, foram obtidos os parâmetros referentes à quantidade do tecido ósseo (BV= volume ósseo e BV/TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas, Tb.N= número das trabéculas e, Po.Tot = porosidade total (em porcentagem)).

Administração dos fluorocromos

Para os grupos de animais que posteriormente seriam submetidos as análises dos tecidos calcificados por microscopia confocal, aos 14 dias e 42 dias do início do experimento (após o término da aplicação do ozônio) foram administrados os fluorocromos calceína e alizarina, respectivamente, na dose de 20 mg/kg pela via intramuscular.

Microscopia confocal a laser

As peças de colo de fêmur coletadas dos animais previamente submetidos a administração de fluorocromos foram encaminhadas a processamento laboratorial dos tecidos calcificados (animais submetidos à eutanásia 8 meses após a ovariectomia), passando pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de a cada 3 dias. As peças em desidratação foram colocadas em

agitador orbital (Kline CT – 150, Cientec –Equipamentos para laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik, Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até a utilização apenas da resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que foi fotopolimerizada e em seguida realizado o protocolo para processamento do Exakt (Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha). O corte e o desgaste das peças foram realizados utilizando um sistema de corte e em politriz automática (Exact Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção da secção de aproximadamente 100 µm de espessura.

Após a obtenção das lâminas, estas foram levadas para a análise em microscópio confocal a Laser Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As imagens obtidas a partir de diferentes secções do colo do fêmur, foram comprimidas a fim de obter melhor ajuste. Depois da seleção da espessura, todos os cortes foram obtidos e operados por meio do z-stack, que permitiu obter o melhor ajuste de imagens que representaram a secção de cada animal dos grupos experimentais. As imagens iniciam desde o início da fluorescência, o que representa, na nossa metodologia, o início da calcificação (precipitação de cálcio na matriz orgânica). Estas imagens possuem a dimensão de 1x1mm² e correspondentes a secções óticas de 512 por 512 pixels. Secções de 2 µm serão escaneadas por 2,5min. Assim 28 cortes foram obtidos para cada 56µm de varredura. Os filtros de barreira utilizados foram o BP 530/30nm e 590 LP, combinados com a ativação do “double dichroic” 488/568nm e o fotomultiplicador foi ajustado em 534 para calceína e 357 para alizarina. Os códigos 534 e 357nm representam os filtros que permitirão visualizar os fluorocromos. Eles são localizados no microscópio e quando a luz da lâmpada de mercúrio passa por essas barreiras e alcança os cortes dos espécimes, é possível visualizar as cores dos fluorocromos. Um dos filtros possibilitam a visualização da calceína (filtro azul) e o outro filtro, a alizarina (filtro verde). As imagens obtidas por microscopia confocal foram reconstruídas através de software para a manipulação do microscópio confocal do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba

- FOA/UNESP (Leica CTR 4000 CS SPE, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Os fluorocromos são componentes químicos que tem a propriedade de se ligar ao cálcio no momento da precipitação na matriz orgânica, assim permitindo mensuração da neoformação óssea. O período de aplicação dos fluorocromos foi aos 14 dias, sendo aplicado a calceína (verde) representando o osso velho. O segundo fluorocromo injetado foi a alizarina no período de 42 dias, marcando em fluorocromos vermelhos, representando o osso novo. A dinâmica do tecido ósseo é representada pelo turnover ósseo, que é observado através da renovação óssea representada pelos fluorocromos vermelhos. Quando maior a prevalência de fluorescência vermelha, maior é a formação de osso novo, enquanto a fluorescência verde representa o osso velho. Essa dinâmica permite observar as duas situações no mesmo corte, podendo observar o que é novo e o que é velho.

O osso do fêmur (região do colo) apresentou duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina), cada sobreposição representa uma precipitação de cálcio de acordo com cada um dos períodos (14 e 42 dias), assim mostrando a conversão de osso velho para osso novo. Essas imagens foram salvas no formato TIFF e analisadas no software ImageJ (Processing Software and Image Analysis, Ontario, Canada) usando a ferramenta “color threshold”, cada imagem foi padronizada de acordo com a tonalidade, saturação e brilho. Primeiro a calceína foi detectada e a ferramenta “measure” foi utilizada para prover a área em μm^2 . O mesmo procedimento foi realizado para a alizarina, obtendo dados da dinâmica do osso alveolar. Além disso, foi calculada a taxa de aposição mineral (Mineral Apposition rate - MAR) a partir das imagens sobrepostas (vermelho/verde), por meio da ferramenta “straight” também do software Image J, mensurando a distância em μm entre o início da precipitação da calceína até o outro extremo da precipitação do vermelho de alizarina.

Análise biomecânica

Parte dos colos dos fêmures dos animais foram removidos para o ensaio mecânico. Os ossos foram retirados e dissecados, identificados por grupo experimental e, em seguida foram envolvidas por gases embebidas em solução

fisiológica e congelados em freezer à temperatura de -20°C, até o momento do ensaio.

Os ensaios mecânicos de flexão 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). Nos ensaios de flexão, três pontos nas amostras anatômicas eleitas para o ensaio foram apoiados sobre dois suportes distanciados 55mm entre eles. Uma célula de carga KRATOS® modelo KM, com capacidade de até 200 kgf foi utilizada e ligada 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).

3.3.1 Análise dos tecidos descalcificados

Processamento histológico das amostras

As peças coletadas das regiões de mandíbula, fêmur e coluna vertebral dos animais dos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN foram inseridas em solução fixadora (formaldeído 4%) por mais 24 horas. Seguiram com a lavagem das peças por 12 horas e assim, as amostras foram desmineralizadas em solução constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Sigma Chemical®), durante 60 dias. Após a descalcificação, as regiões correspondentes ao alvéolo mandibular do primeiro molar e colo do fêmur foram separadas. Assim, juntamente com as peças de coluna vertebral,

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 de corte com 5 µm de espessura e a confecção 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), sendo analisada a cronologia do reparo ósseo na região do alvéolo, observando a diferença entre os grupos experimentais com ênfase nos parâmetros de qualidade com avaliação da angiogênese e maturidade do tecido ósseo (osteoblastos e osteócitos) e quantidade de tecido ósseo, assim como presença de células do processo inflamatório.

Histologia/Histometria

Padrão 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 espaço 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 réguas que equidistam a 100 um, 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.

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 interadicular 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.

Contagem de células inflamatórias

Todas as etapas metodológicas mencionadas no item anterior foram realizadas também neste item para a contagem das células inflamatórias, com ênfase em linfócitos. Portanto, diante dos dados obtidos para os diferentes grupos experimentais (SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN) foi possível notar 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 mandíbula e somente 30 dias para coluna vertebral).

3.3.3 Análise estatística dos dados

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 $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da microarquitetura óssea

A análise foi realizada usando a microtomografia computadorizada (microct) SkyScan 1176 Bruker MicroCT, 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)³².

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 (caracterização óssea) 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 6 e 7).

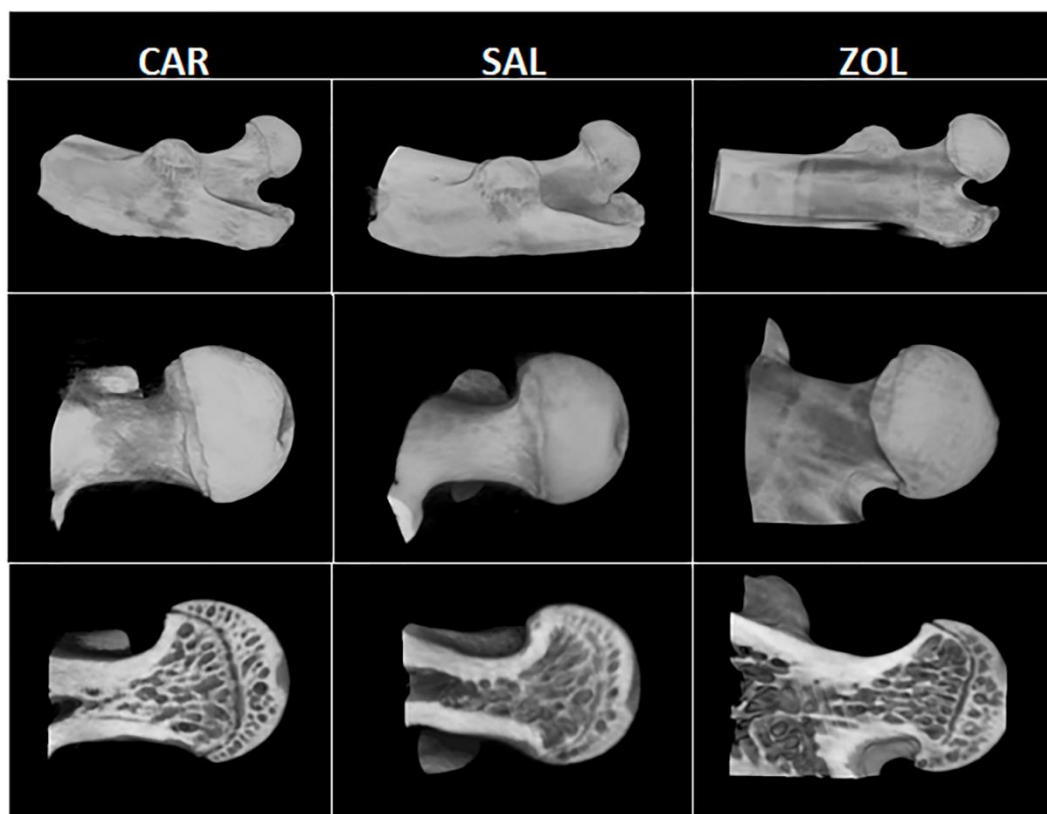


Figura 6 - Figura representativa da reconstrução microtomográfica dos grupos CAR, SAL e ZOL, observa-se uma diminuição das trabéculas e aumento das corticais no osso da região de cabeça femoral dos grupos ZOL em relação ao CAR e SAL.

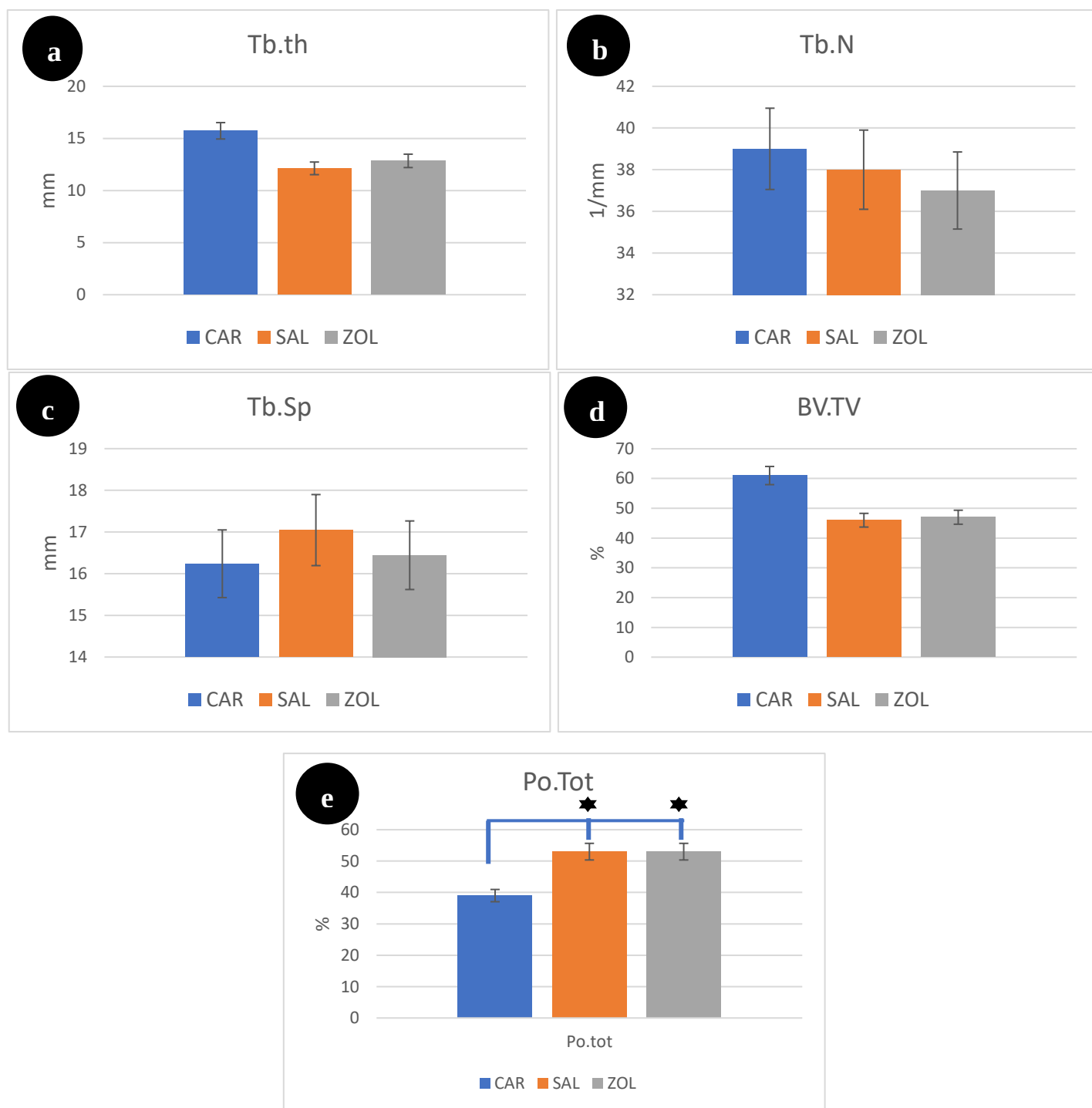


Figura 7 - Representação gráfica da microtomografia da região de cabeça femoral dos animais da caracterização, observa-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo CAR e os grupos SAL e ZOL nos parâmetros (BV.TV/Tb.Th) (a, d)), no parâmetro Po.Tot (e) os grupos SAL e ZOL apresentaram diferença estatisticamente significante em comparação ao grupo CAR.

4.2 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 8,10 e 12).

4.2.1 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 8).

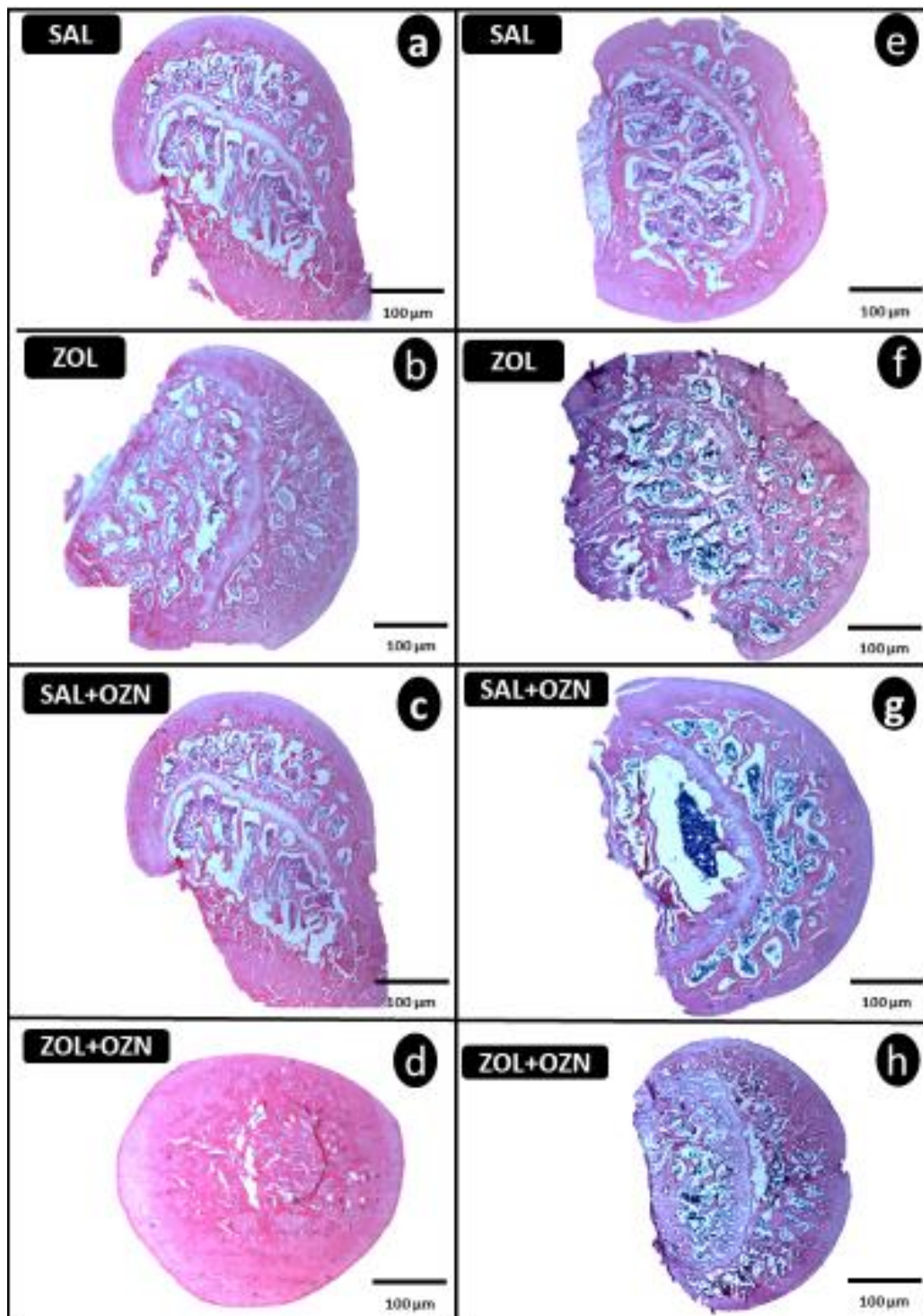


Figura 8: Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de colo femoral, nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, f), SAL+OZN (c, g), ZOL+ OZN (d, h) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. No período de 30 dias (a, c, d, e), o grupo ZOL+OZN apresentou maior área de tecido 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. Escala aplicada 100µm.

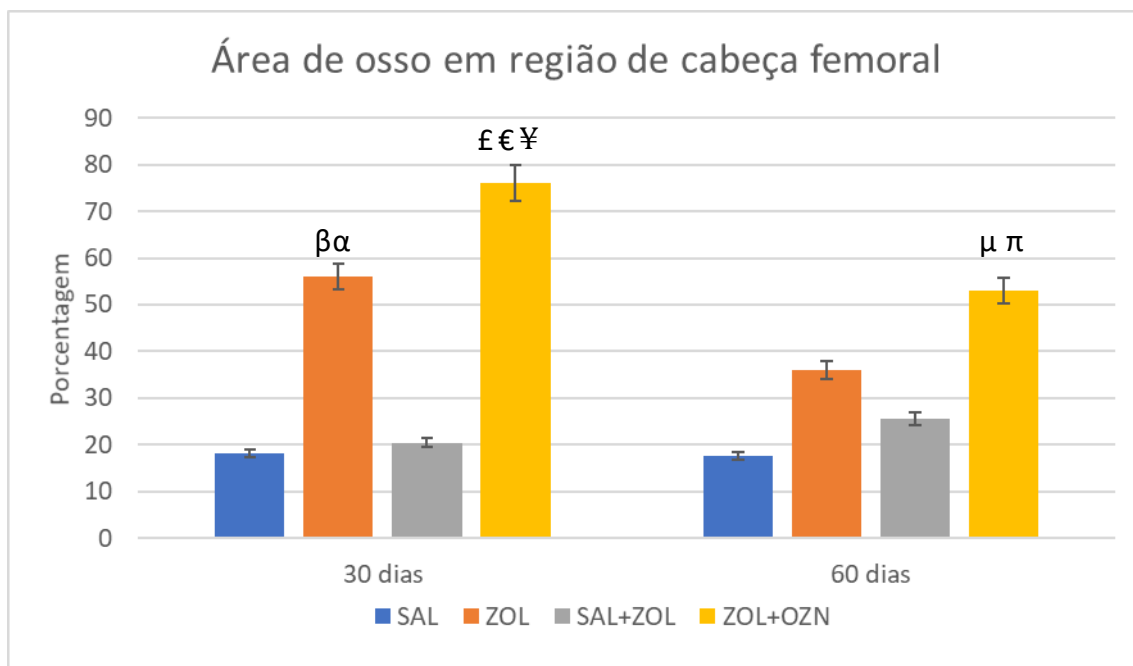


Figura 9 – Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região de cabeça femoral representado em porcentagem de tecido ósseo. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observa-se no período de 30 dias diferença estatisticamente significativo entre os grupos 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)

Na análise histométrica da coluna vertebral aos 30 dias, a menor porcentagem de tecido ósseo foi observada no grupo SAL (12,73±5,44) diferindo dos demais grupos que apresentaram os maiores valores de tecido ósseo [SAL+OZN (27,81±18,50), (ZOL (42,86±7,36), e ZOL+OZN (59,22±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 10 e 11).



Figura 10 - 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.

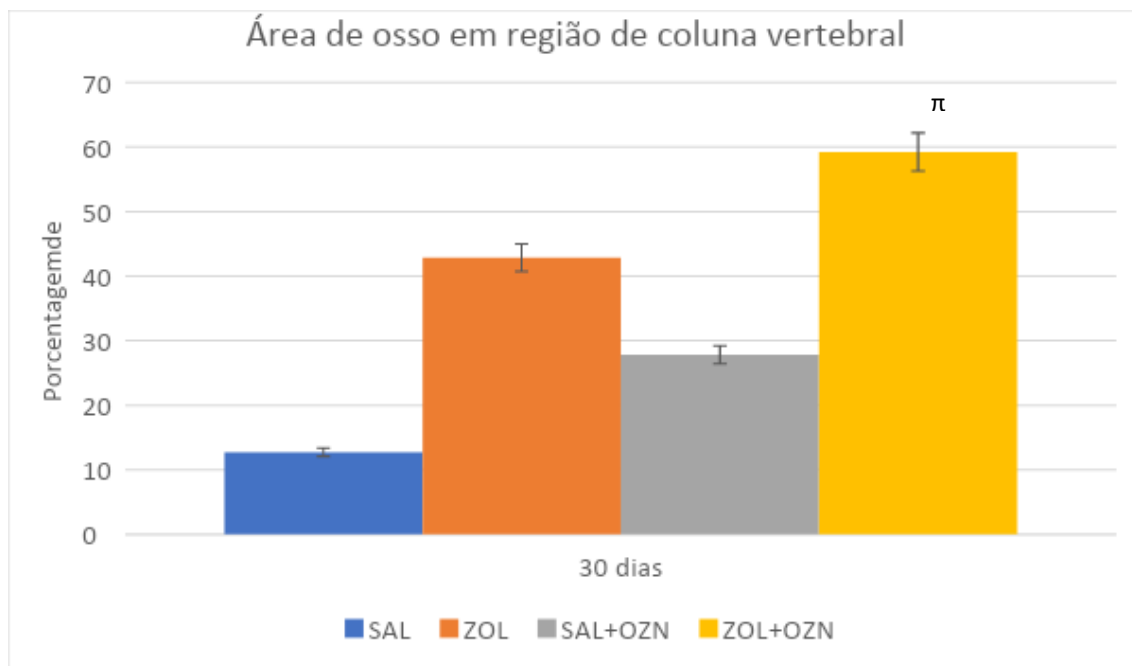


Figura 11 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região de coluna vertebral representado em porcentagem de tecido ósseo. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ZOL+OZN e SAL.

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 estatisticamente significativa entre os grupos SAL ($28,8 \pm 10,13$), ZOL ($30 \pm 1,58$), SAL+OZN ($25,8 \pm 1,92$), ZOL+OZN ($30,6 \pm 2,6$) 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 12 e 13).

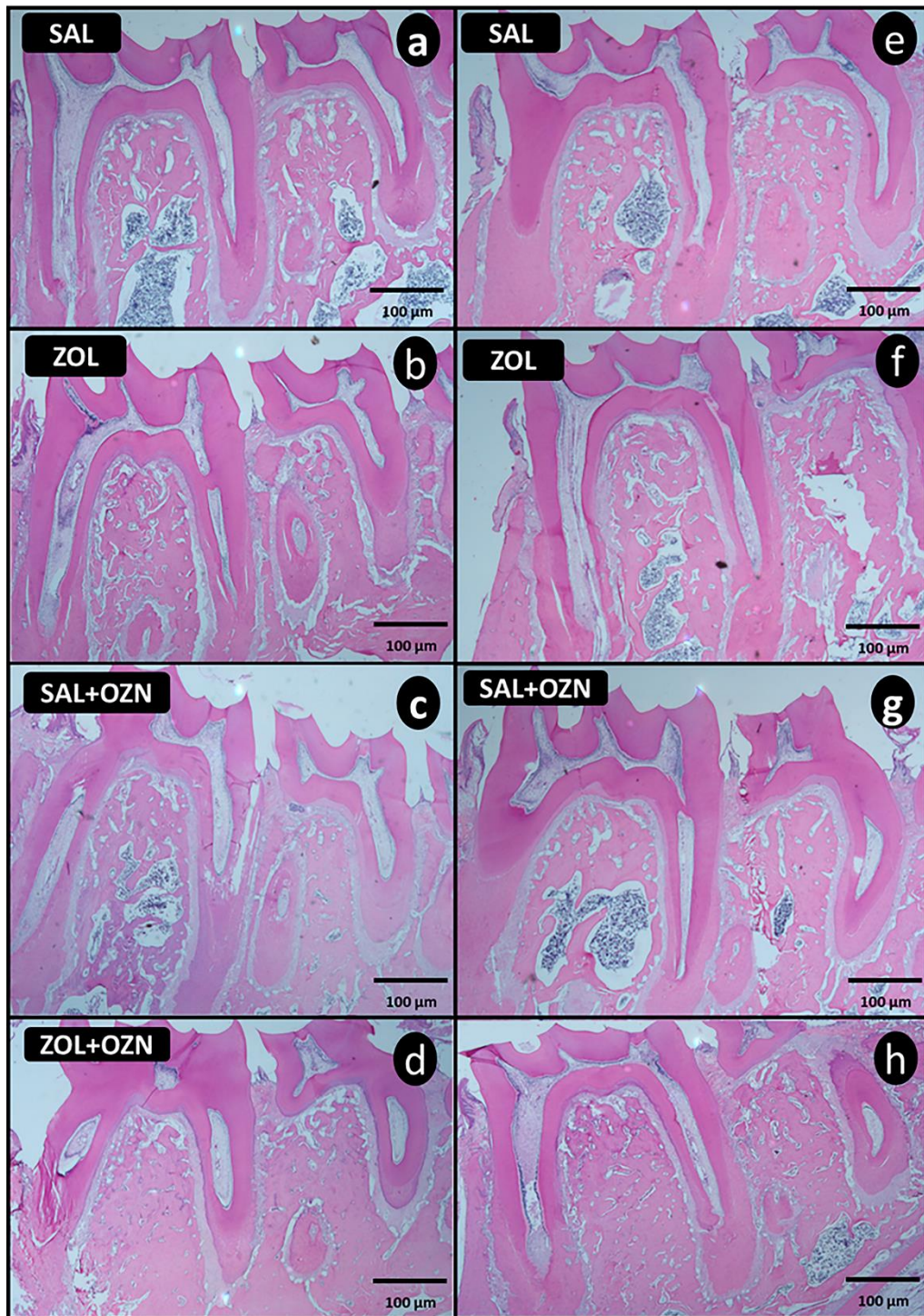


Figura 12 - Imagem histológica representativa da área de tecido ósseo em região de mandíbula, nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, f), SAL+OZN (c, g), ZOL+ OZN (d, h) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (e, f,g,h) dias. No período de 30 dias (a, c, d, e). No período de 30 dias não foi observado diferença 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. Escala aplicada 100µm.

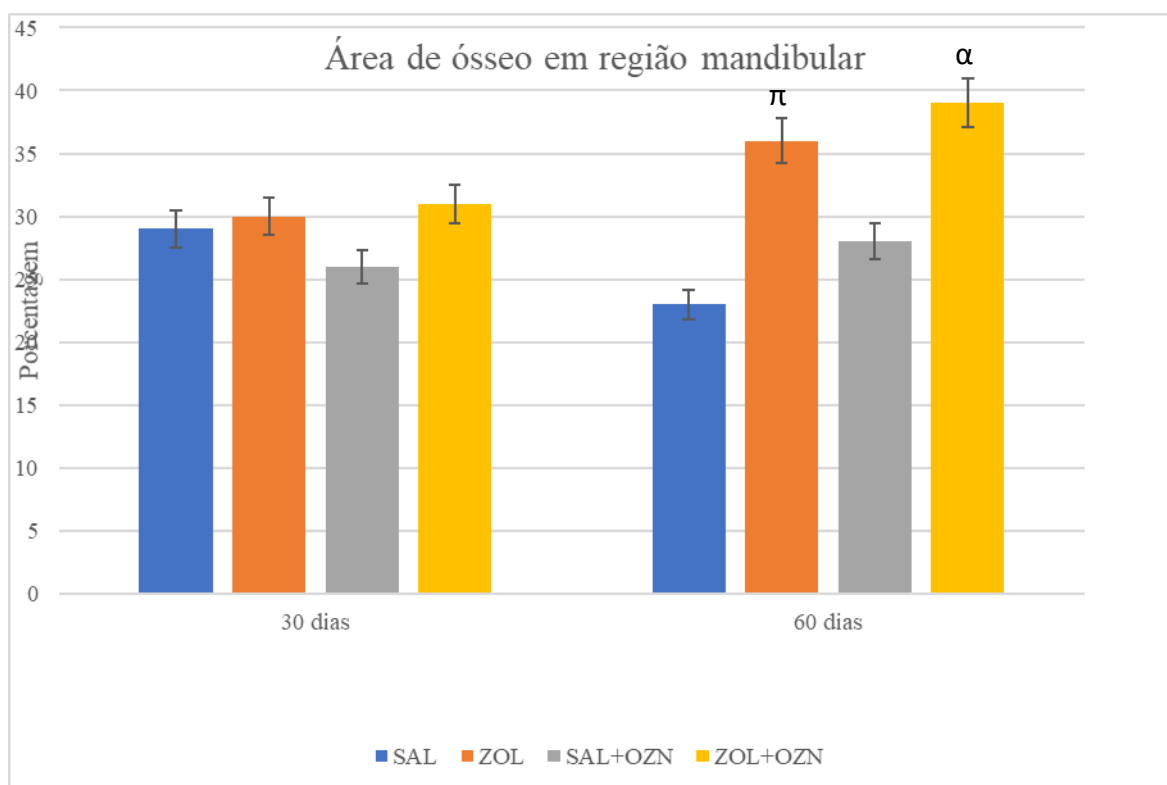


Figura 13 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo em região mandibular representado em porcentagem de tecido ósseo, os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. No período de 30 dias não se observou diferença entre os grupos SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN. 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).

4.2.2 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 14 (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 19). Aos 60 dias, a comparação ZOL+OZN ($8 \pm 2,3$) vs ZOL ($5 \pm 1,44$) apresentou relevância estatisticamente significativa ($p = 0,045$), tendo os grupos SAL ($6 \pm 3,0$) e SAL+OZN ($8 \pm 2,9$) apresentado resultados semelhantes estatisticamente (Figura 15)

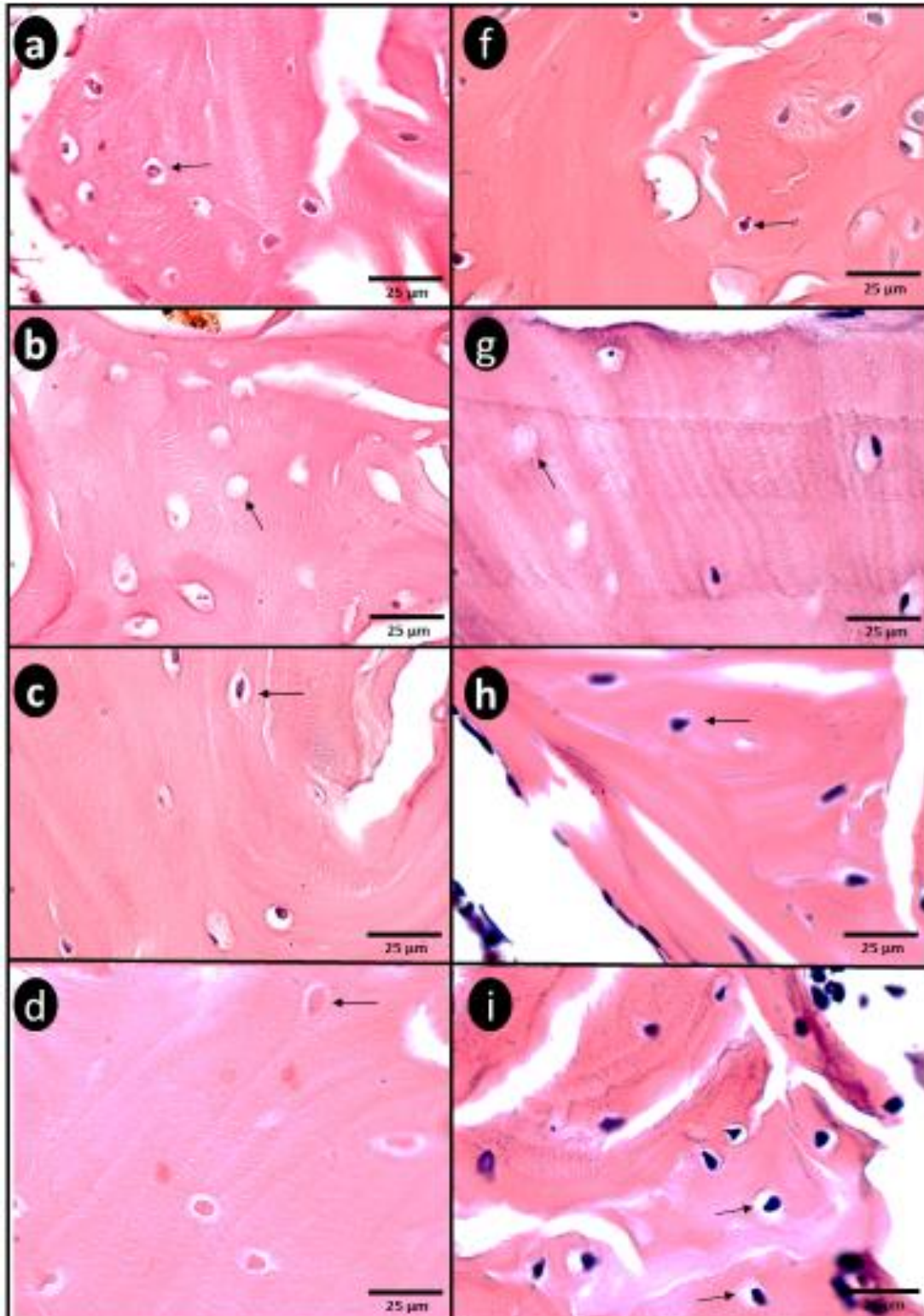


Figura 14 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área de cabeça femoral buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, 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. Escala aplicada 25 μ m.

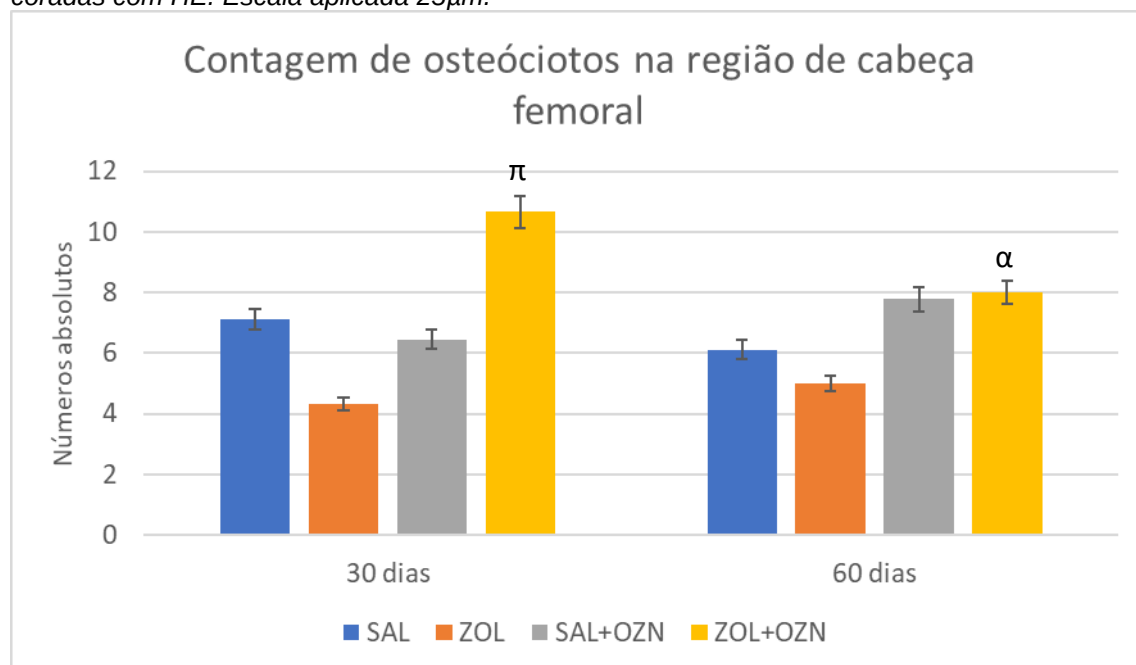


Figura 15 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região de cabeça femoral usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Aos 30 dias, observou-se resultados estatisticamente significativos 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.

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 16 e nas comparações intergrupos. ($p > 0,05$, Teste Anova 1 fator) (Figura 17).

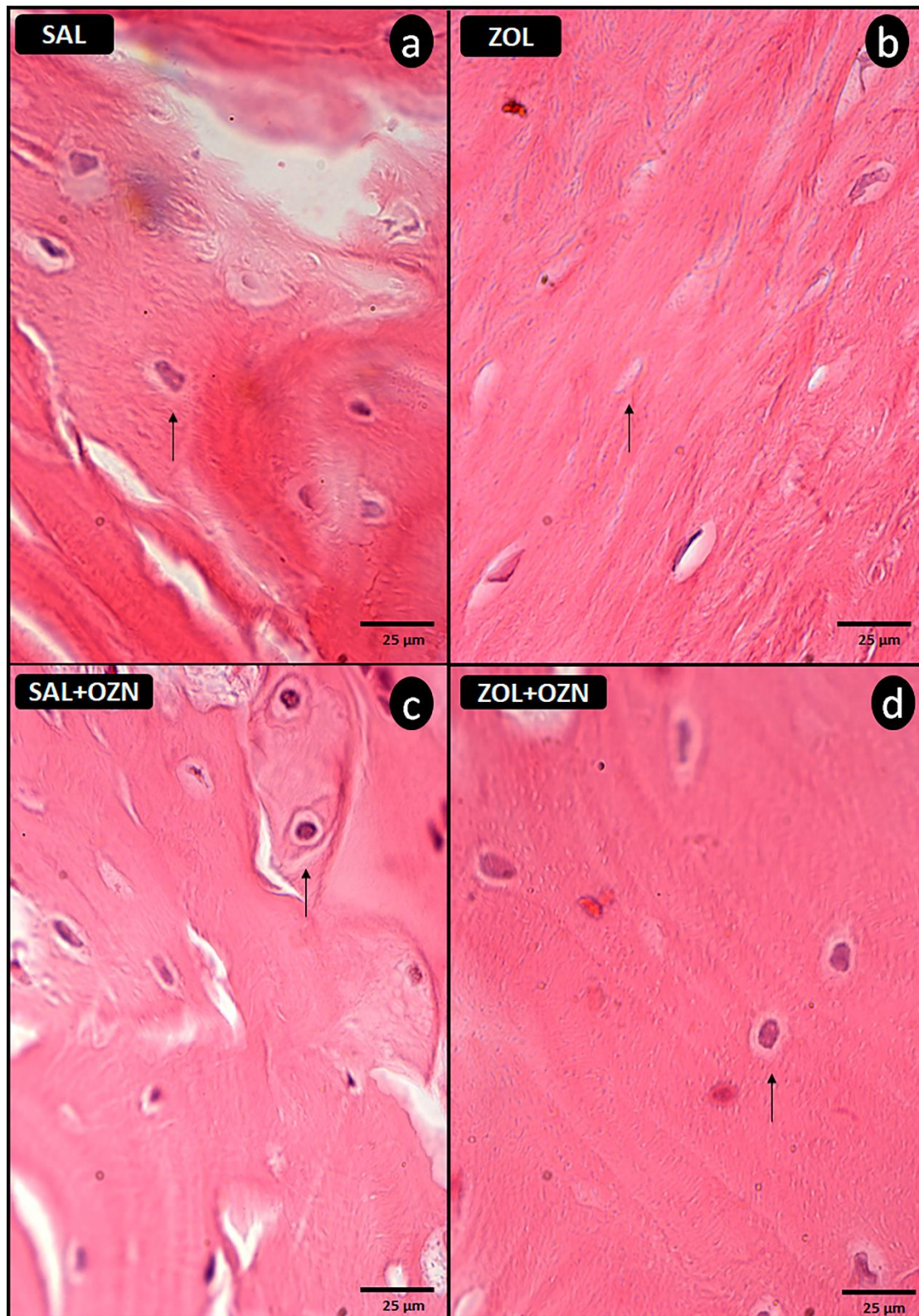


Figura 16 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área de coluna vertebral buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a), ZOL (b), SAL+OZN (c) e ZOL+OZN (d) nos períodos de 30 (a, b, c, d) dias. Observou-se número 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.

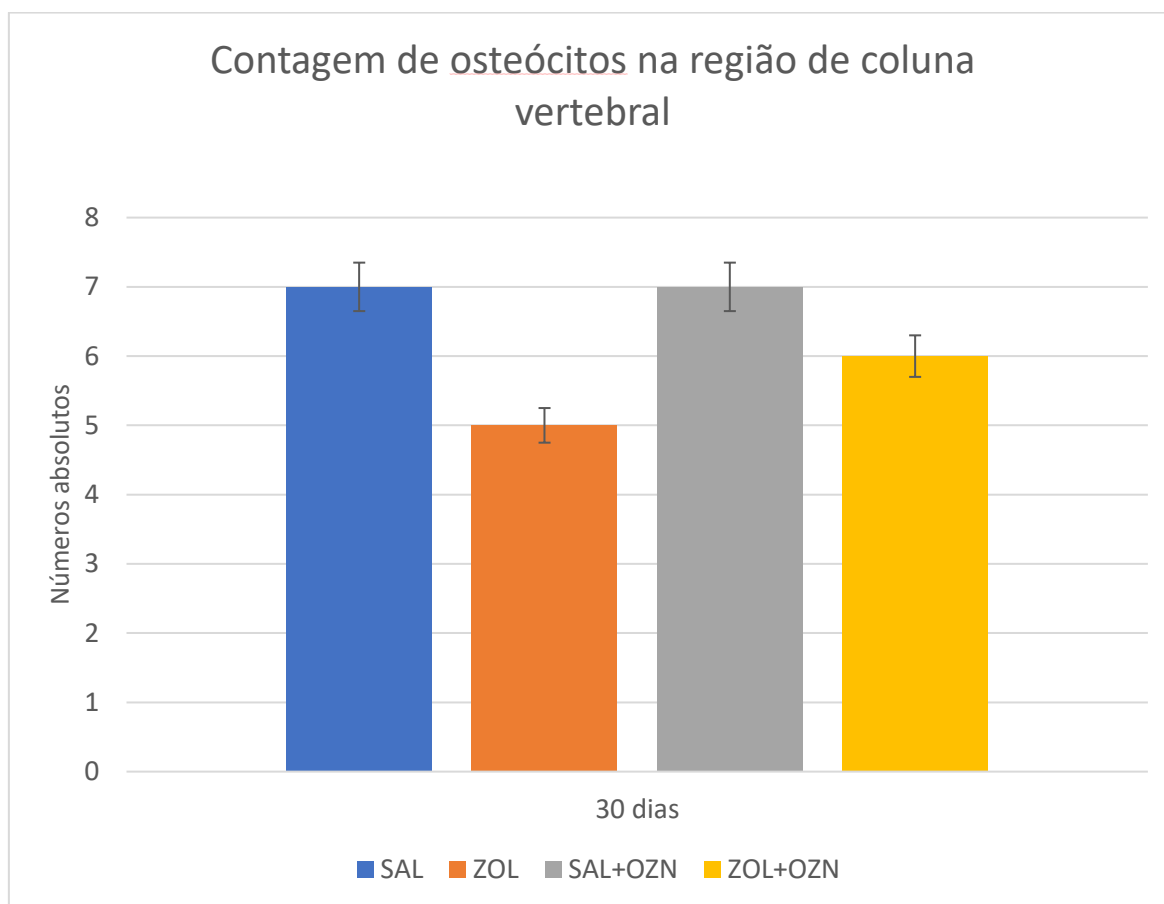


Figura 17 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região de coluna vertebral usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 dias. Os resultados estatísticos não foram significativos para os grupos analisados.

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=ZOL=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). O grupo SAL+OZN ($11,4 \pm 2,8$) não apresentou diferença estatística em relação aos outros grupos. (Figuras 18 e 19).

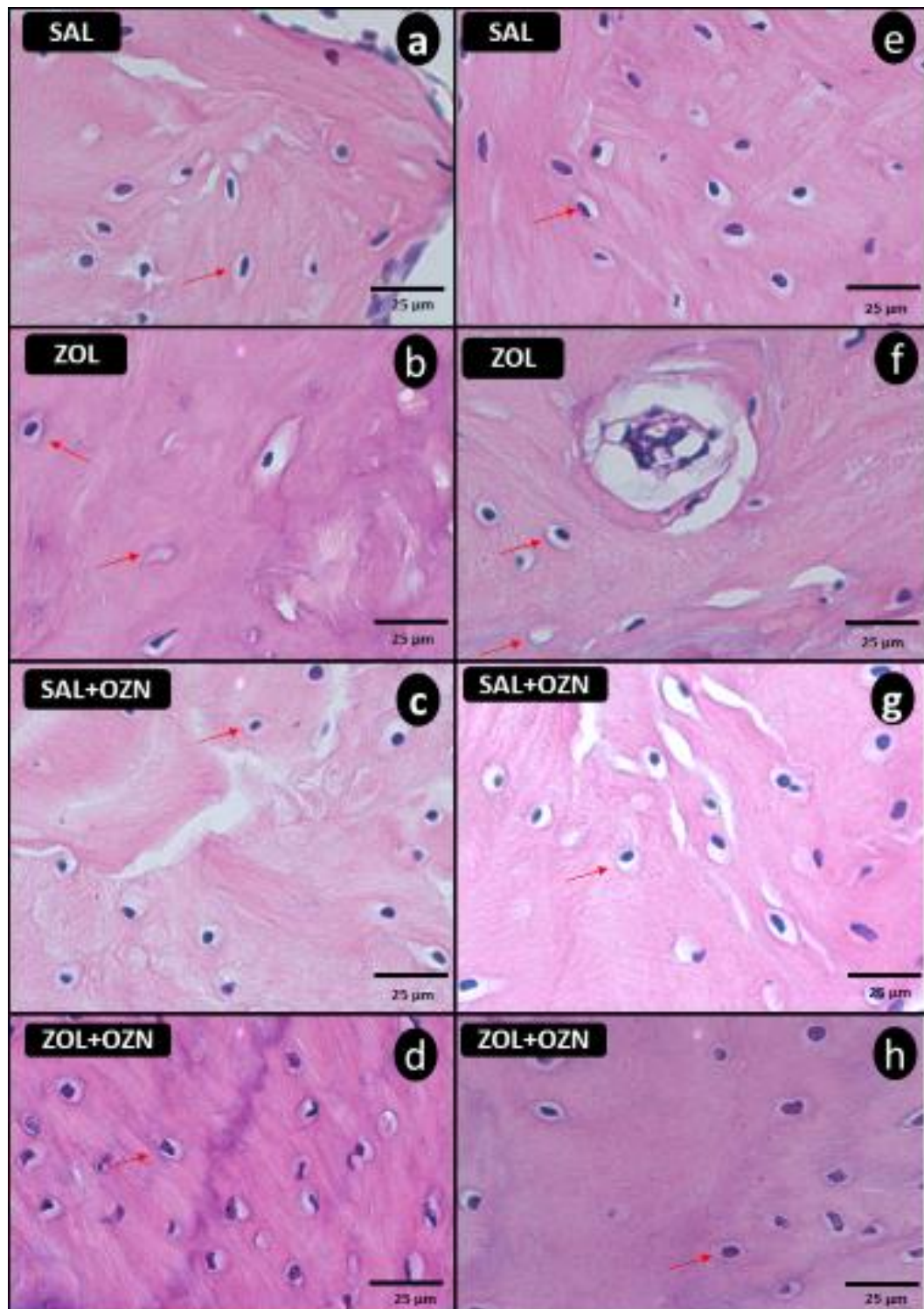


Figura 18 - Histologia representativa da área de tecido ósseo na área mandibular buscando evidenciar áreas de tecido ósseo vital representada por meio dos osteócitos. Os grupos representados são SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) 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. Escala aplicada 25μm.

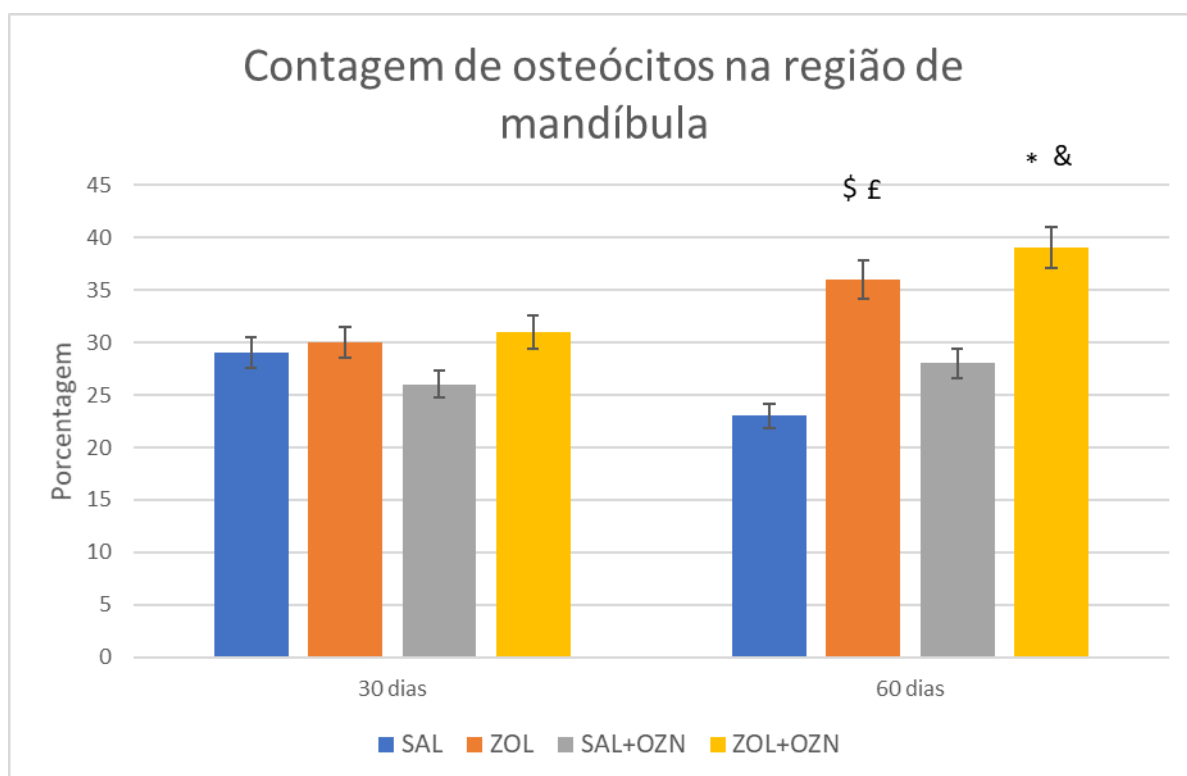


Figura 19 - Gráfico representativo da área de tecido ósseo vital em região mandibular usando o número absoluto de osteócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. No período de 30 dias não foi observado diferença estatisticamente significante entre os grupos analisados. No período de 60 dias observou-se diferença estatisticamente significante 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.

4.2.3 Contagem de células inflamatórias

As imagens representativas do padrão inflamatório nas regiões de cabeça femoral, coluna vertebral e mandíbula podem ser visualizadas nas figuras 20, 22 e 24. 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 ($p>0,05$) (SAL $3\pm1,67$, ZOL $3,4\pm1,23$, SAL+OZN $4,6\pm1,5$, ZOL+OZN $5,6\pm2,39$) (Figura 21).

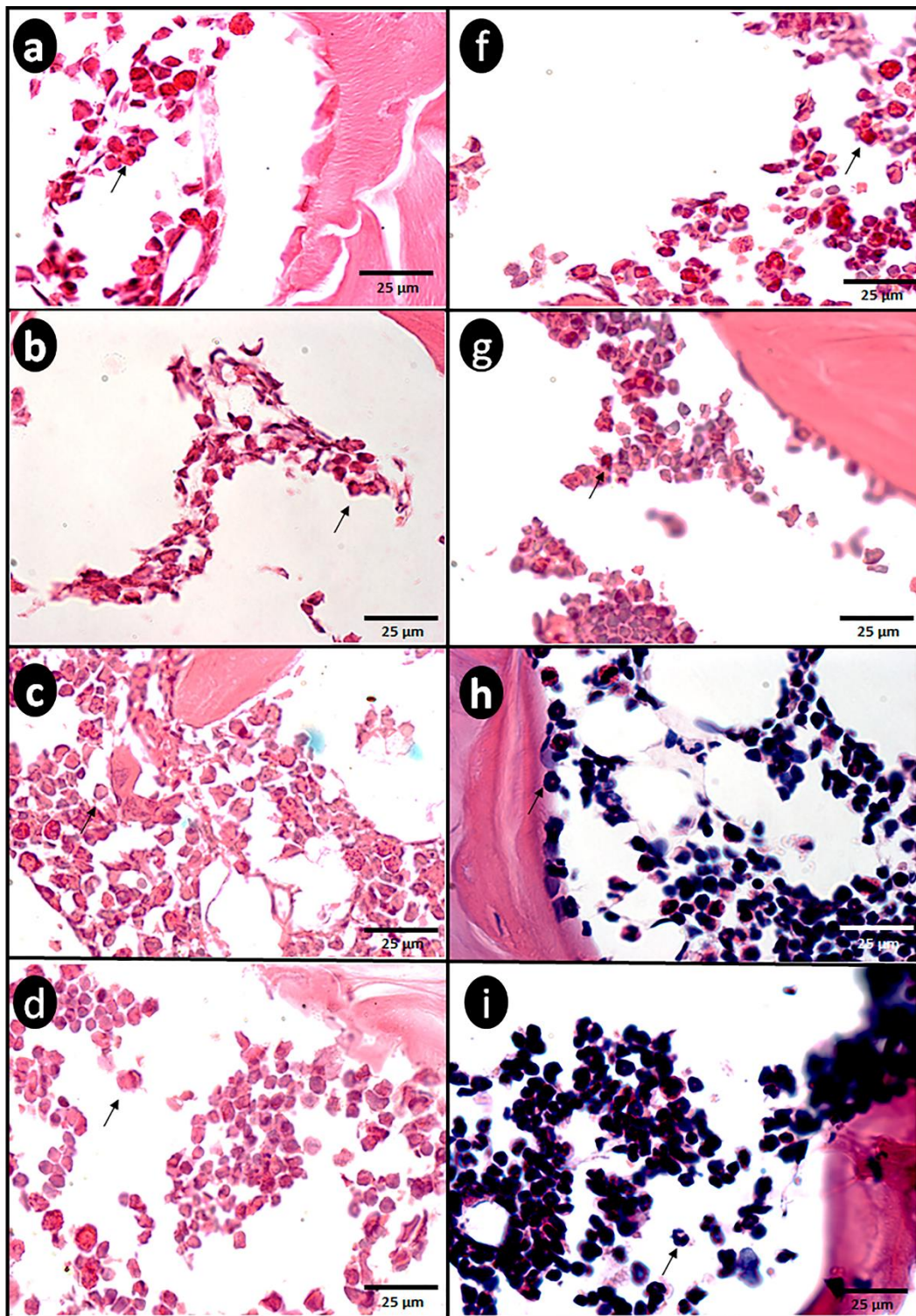


Figura 20 - Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de cabeça femoral, presentes nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número reduzido de células inflamatórias nos grupos SAL 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. Escala aplicada 25µm.

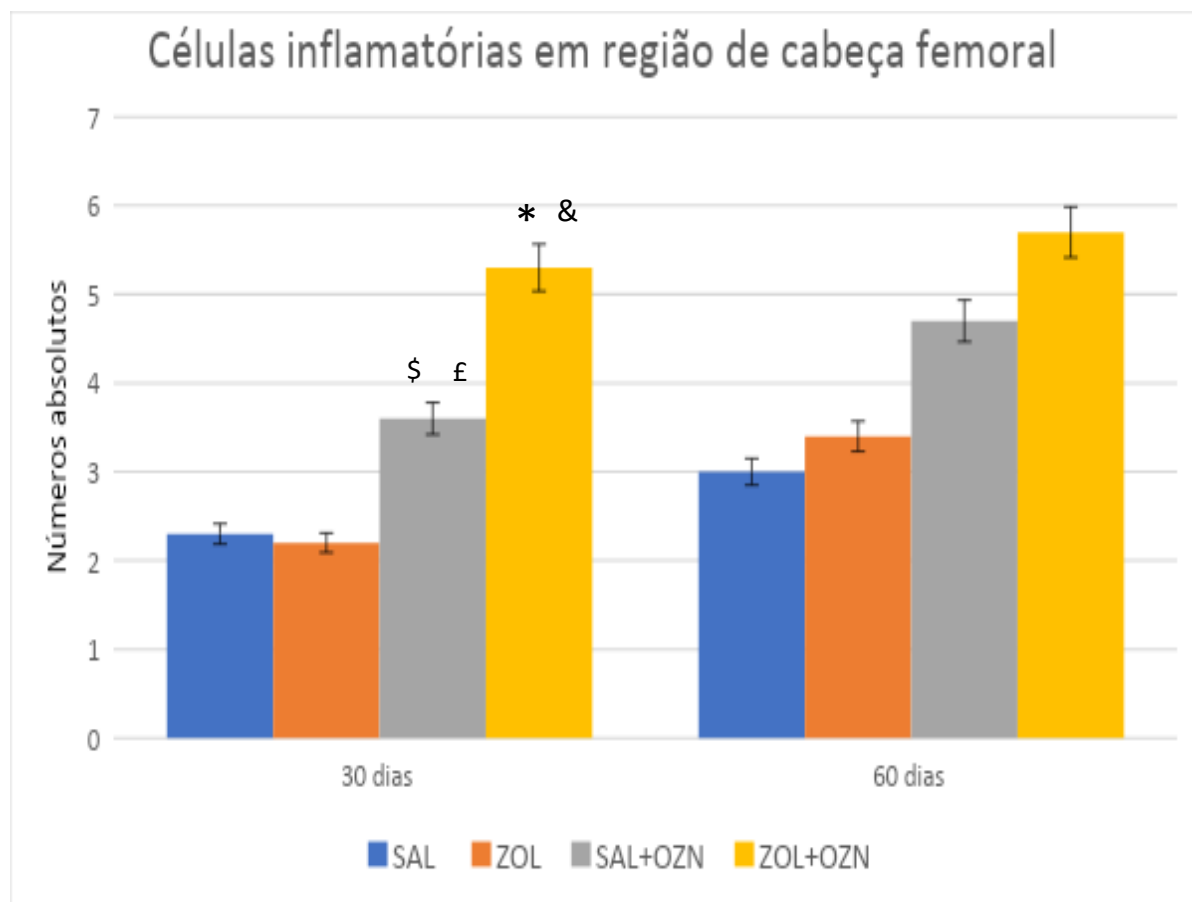


Figura 21 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de cabeça femoral usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação 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.

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 22 e 23).

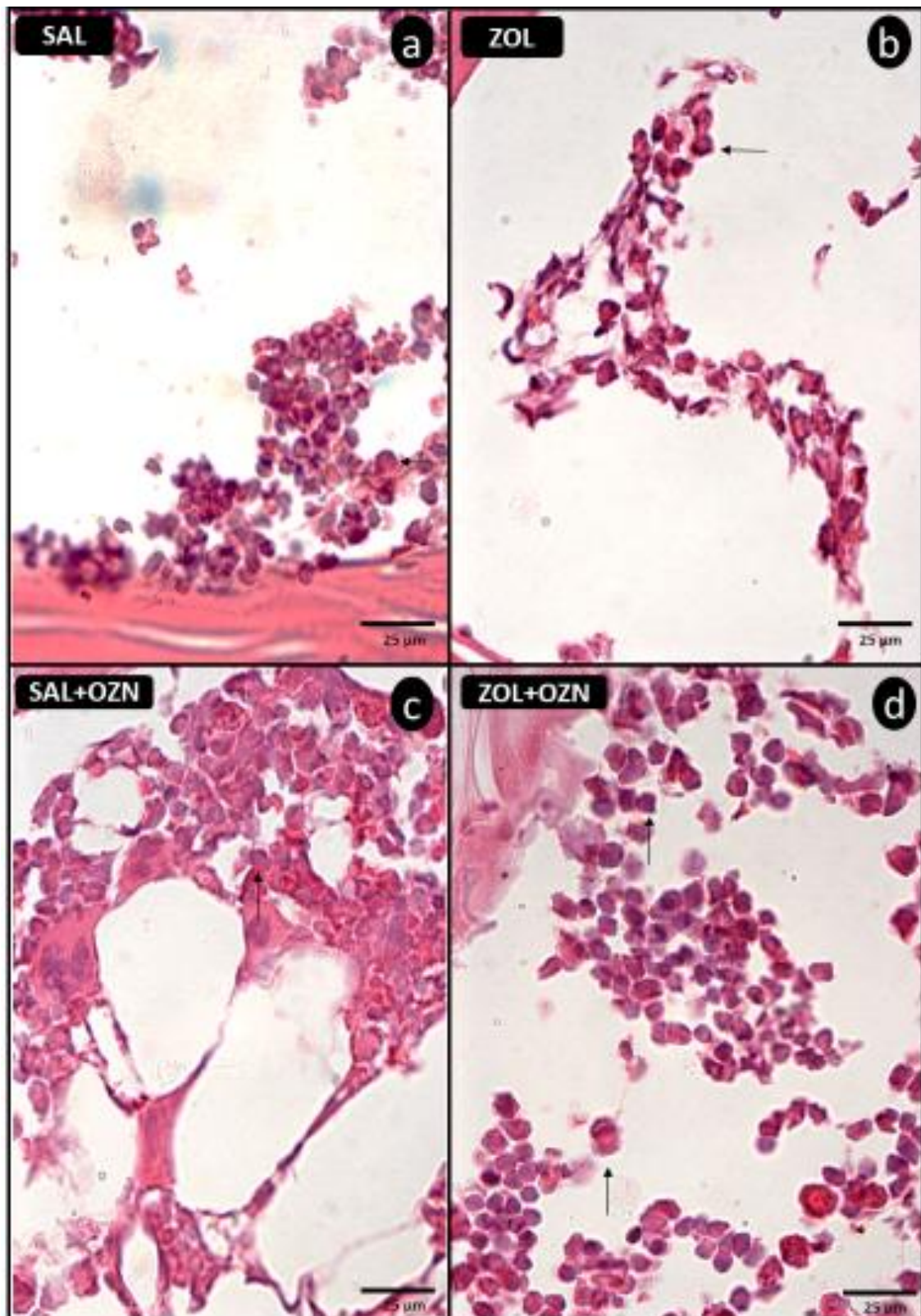


Figura 22 - Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de coluna vertebral, presentes nos grupos SAL (a), ZOL (b), SAL+OZN (c) e ZOL+OZN (d) nos períodos de 30 (a, b, c, d) dias. Observa-se número semelhante de células inflamatórias nos grupos SAL, ZOL e SAL+OZN, porém nos grupos ZOL+OZN nota-se um aumento no número de linfócitos. Lâminas coradas com HE. Magnificação de 1000x. Escala aplicada 25µm.

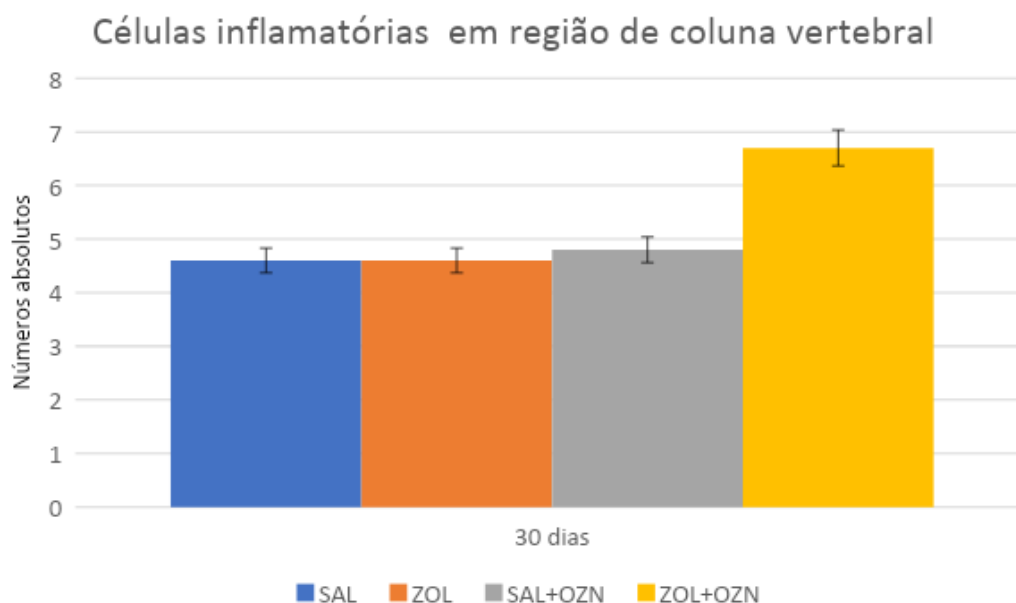


Figura 23 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de coluna vertebral usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 dias. Observou-se resultados sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

Para região mandibular, o número de células inflamatórias seguiu a tendência dos resultados observados em cabeça femoral, no período de 30 dias não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos (SAL $13,33 \pm 4,7$, ZOL $13,06 \pm 3,8$, SAL+OZN $12,8 \pm 2,48$, ZOL+OZN $12,53 \pm 4,21$) 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 $p < 0,05$) (figuras 24 e 25).

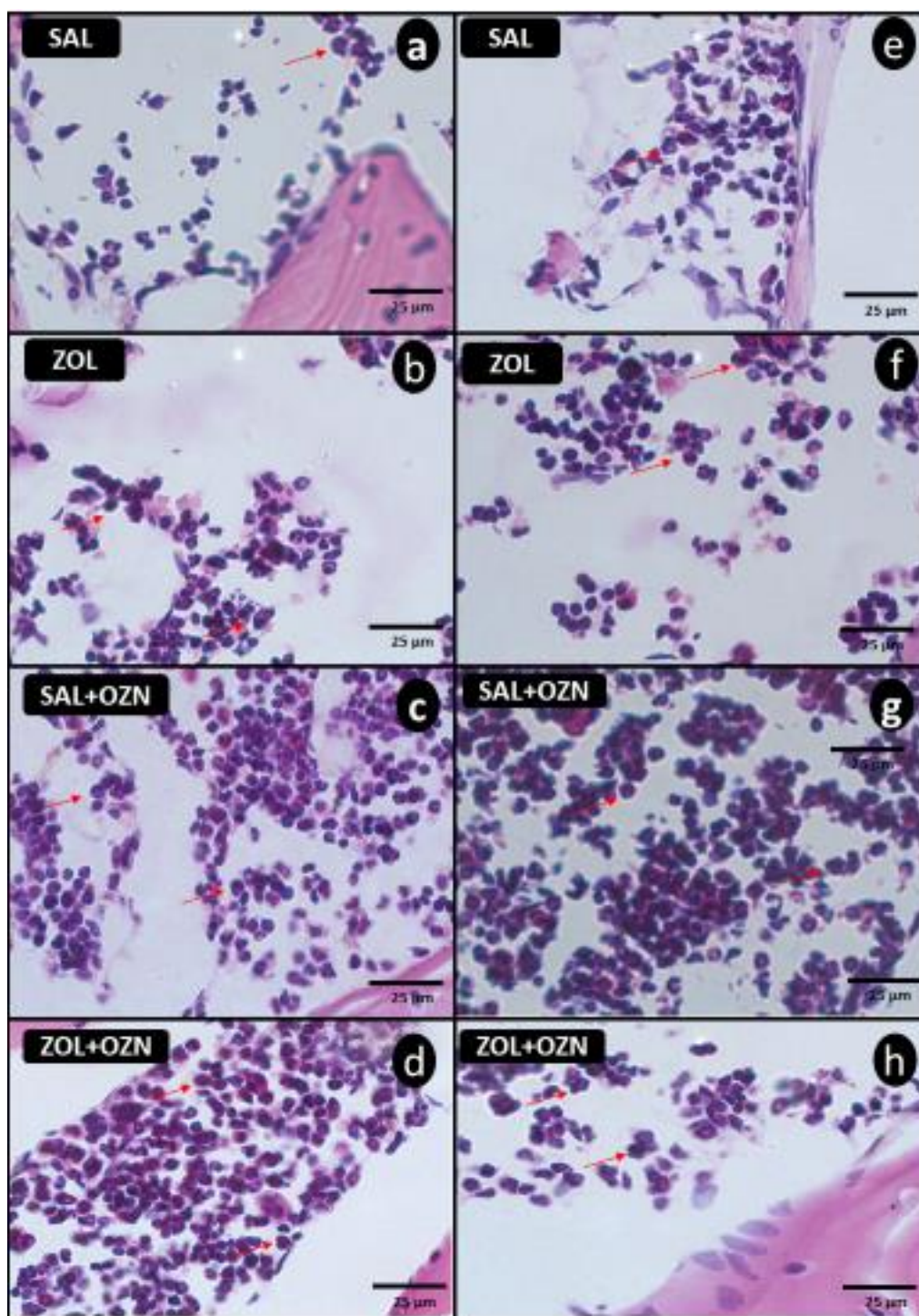


Figura 24- Histologia representativa das células inflamatórias (linfócitos) na área de mandíbula, presentes nos grupos SAL (a, f), ZOL (b, g), SAL+OZN (c, h) e ZOL+OZN (d, i) nos períodos de 30 (a, b, c, d) e 60 (f, g, h, i) dias. Observa-se número reduzido de células inflamatórias nos grupos SAL e ZOL. 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. Escala aplicada 25µm.

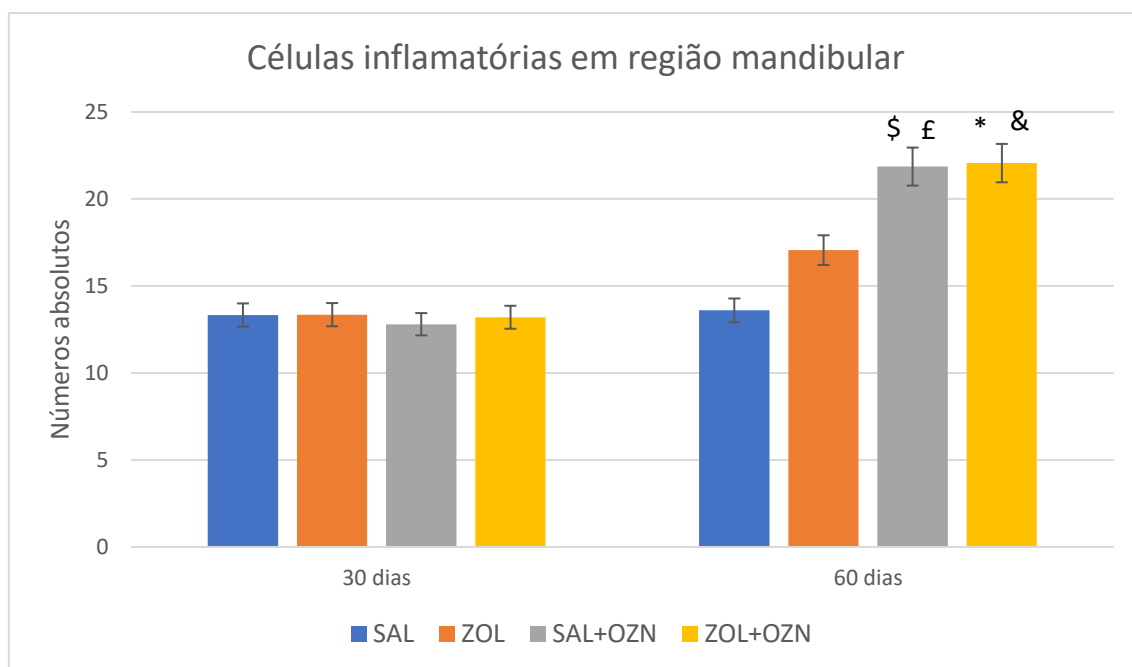


Figura 25 - Gráfico representativo do número de células inflamatórias em região de mandíbula usando o número absoluto de linfócitos como parâmetro. Os grupos demonstrados são SAL, ZOL, SAL+OZN e ZOL+OZN nos períodos de 30 e 60 dias. Observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação 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.

4.3 Análise biomecânica

4.3.1 Análise biomecânica em colo de fêmur

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 ($298,89 \pm 101,98$) e ZOL ($585,84 \pm 75,06$) ($p < 0,05$), possuindo as seguintes interações estatísticas: **SAL+ZOL=ZOL+OZN>SAL=ZOL** (Figura 26). Já para a análise necessária para deformar 0,3 mm do colo 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 ($9,4 \pm 3,61$) ($p < 0,05$). O grupo ZOL ($14,43 \pm 0,6$) não apresentou diferença estatística em relação aos outros grupos (Figura 27).

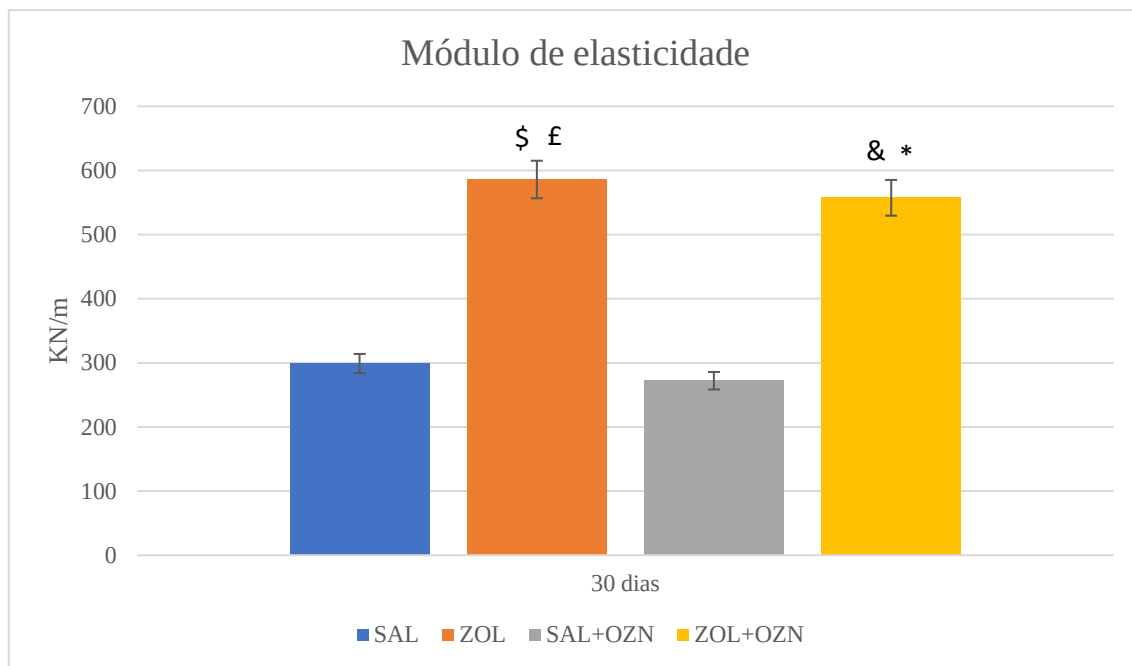


Figura 26 - Gráfico representativo do módulo de elasticidade do teste biomecânico realizado na região de colo femoral referente aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL e os grupos SAL e SAL+OZN (\$, £), da mesma forma, foi observado resultados estatisticamente significantes na comparação dos grupos ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (&, *).

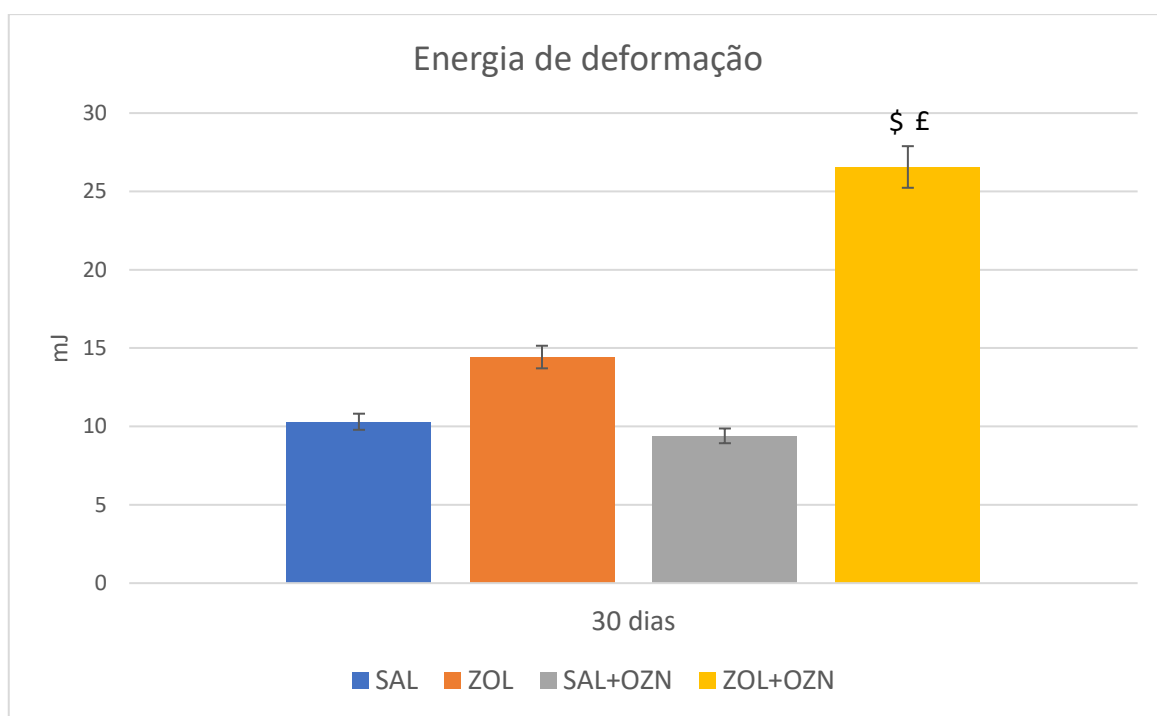


Figura 27 - Gráfico representativo da energia de deformação do teste biomecânico realizado na região de colo femoral referente aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN no período de 30 dias. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo ZOL+OZN e os grupos SAL e SAL+OZN (\$, £).

4.4 Análise de fluorocromos em microscopia confocal a laser

Os fluorocromos se ligam ao cálcio no momento da precipitação na matriz orgânica, permitindo a mensuração da neoformação óssea através da calceína (verde) representando o osso velho e a alizarina (vermelho) representando o osso novo, devido a injeção em tempos diferentes.

Sendo assim, os resultados obtidos mostram uma precipitação maior de cálcio no período de 14 dias (osso velho, representado pela calceína) nos grupos tratados com ácido zoledrônico (ZOL 459209 $\pm$ 119264,7 e ZOL+OZN 367886,2 $\pm$ 104836,3) quando comparados com os grupos tratados com solução salina (SAL 14821,8 $\pm$ 6148,2 e SAL+OZN 89817,4 $\pm$ 18191,56) ($p<0,05$) (figuras 28 e 29).

Quanto à marcação por alizarina, que representa o osso renovado (precipitação de cálcio no período de 42 dias), na comparação entre os grupos SAL+OZN (287997,8 $\pm$ 97384,36) e os grupos ZOL (38302 $\pm$ 17853,75) e ZOL+OZN (122740,6 $\pm$ 50417,25) observou-se diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$), assim como também a análise dos grupos SAL (230040 $\pm$ 14682,92) e ZOL mostraram resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$) (figuras 28 e 29).

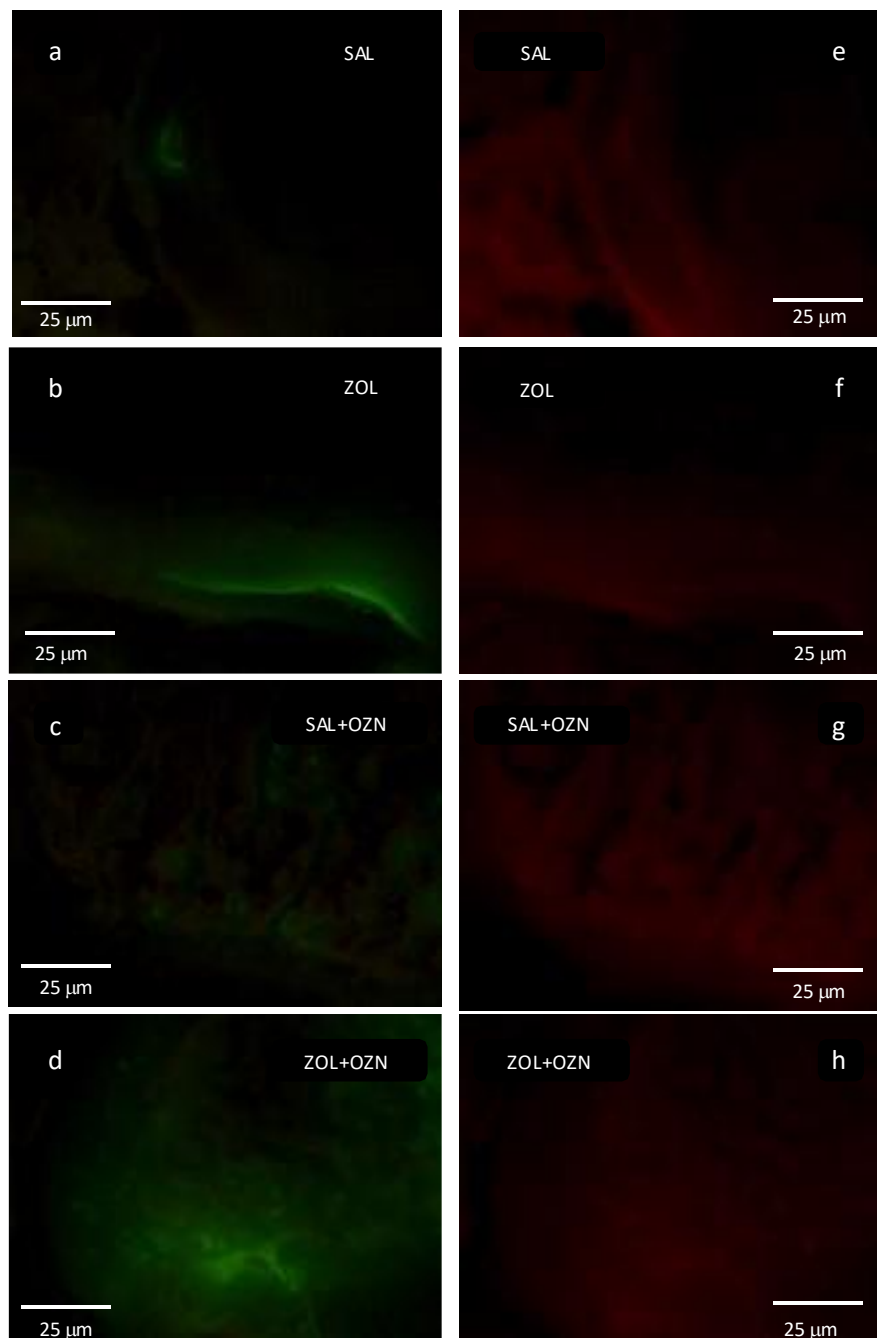


Figura 28: Fotos representativas da área de tecido ósseo de colo de fêmur em microscopia confocal a laser, evidenciando a presença dos fluorocromos calceína (a,b,c,d) e alizarina (e,f,g,h). Os grupos representados são SAL (a,e), ZOL (b,f), SAL+OZN (c,g) e ZOL+OZN (d,h). Observa-se maior marcação da calceína nos grupos tratados com ácido zoledrônico (ZOL e ZOL+OZN) quando comparados aos grupos não tratados (SAL e SAL+OZN), enquanto na alizarina observa-se maior marcação nos grupos não tratados com zoledronato (SAL e SAL+OZN) quando comparados aos grupos tratados (ZOL e ZOL+OZN). Escala aplicada 25µm.

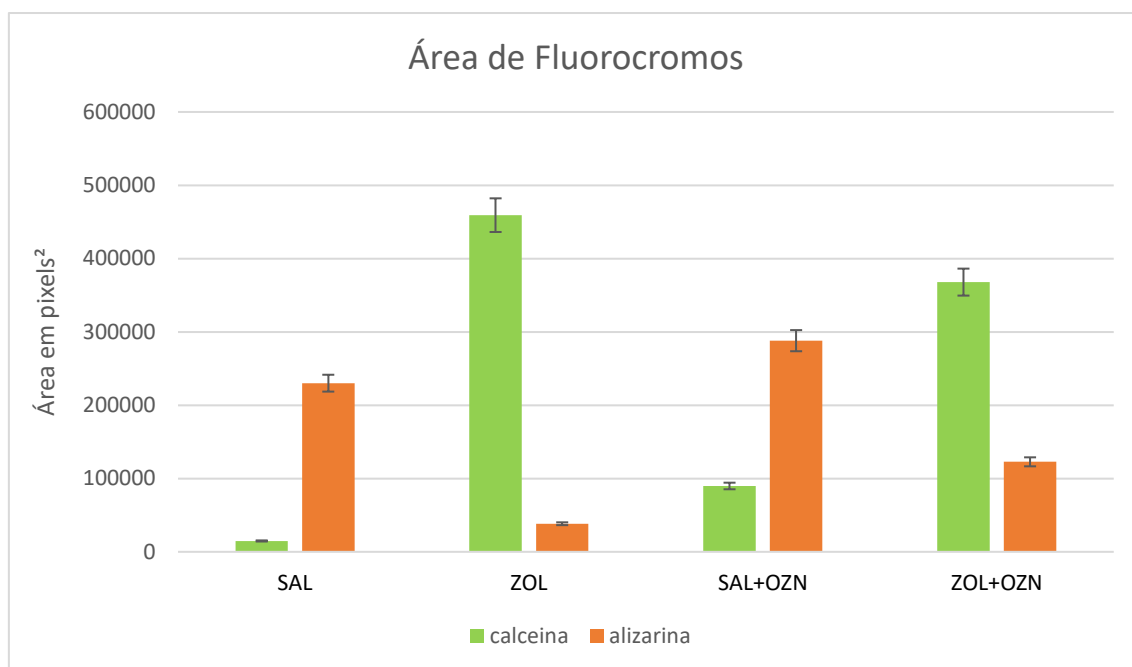


Figura 29: Gráfico representativo da área de Fluorocromos (pixels²) em colo de fêmur das ratas referente aos grupos SAL, ZOL, SAL+OZN, ZOL+OZN no período de 60 dias. Quanto à calceína (verde), observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos SAL+OZN e ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL. Sobre a alizarina (vermelho), também observou-se resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos SAL+OZN e ZOL+OZN e os grupos SAL e ZOL.

5. DISCUSSÃO

As aplicações biomédicas do ozônio são relatadas para o reparo de feridas cutâneas, incorporação de enxertos e tratamento da doença periodontal^{21, 22, 26, 59}, 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, biomecânico e pela análise de fluorescência em microscópio confocal a laser, quando comparado 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 vertebral 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, consequentemente manter a quantidade/densidade de tecido ósseo^{4, 41, 60}.

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 implantes⁶¹ e osteonecrose dos maxilares^{16, 62 - 64}. 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

microcirculação⁶⁵, e aumentar o número de osteoblastos²⁶. Os resultados do presente estudo corroboram com Ozdemir et al. (2013)²⁶, 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^{66 – 68}. Os resultados da biomecânica observados no estudo de Dayisoylu et al. (2013)⁴³ 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+OZN 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 imunomoduladoras, antioxidantes e de microcirculação^{28, 69, 70}. Através destas evidências, tomadas em conjunto com os resultados aqui obtidos pela análise de fluorescência em microscopia confocal à laser, especula-se a existência de uma maior renovação óssea nos grupos tratados com a ozonioterapia em associação (SAL+OZN e ZOL+OZN), quando comparado aos seus respectivos grupos sem a associação (SAL e ZOL). Desta forma, o ozônio demonstra uma capacidade de modular de forma considerável o dinamismo ósseo, estimulando a deposição de matriz óssea vital especialmente nas ratas tratados 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 bisfosfonatos e com meia vida de 10 a 12 anos^{18, 64}. 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, tendo em vista que, 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, desenvolvem maior força de “ação mastigatória” na região de incisivos, os molares apresentam uma ação de trituração e, conseqüentemente, pode-se compreender os resultados bastante evidentes da ação medicamentosa no corpo da mandíbula. 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.

É importante salientar que mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa para a histometria na porção estudada da mandíbula, na comparação entre os grupos ZOL e ZOL+OZN, as lâminas histológicas mostraram no tecido interradicular dos molares analisados um perfil de osso com mais espaços trabeculares, e com maior celularidade quando a aplicação do OZN foi realizada, sendo a diferença nos valores mais evidente para a região de cabeça de fêmur. A explicação para essas diferenças está provavelmente na limitação do modelo animal para a análise da dinâmica óssea dos ossos maxilares. Os ratos são roedores, e com isso, a biomecânica dos molares é bem menor quando comparado ao que ocorre nos seres humanos. Isso faz com que a demanda metabólica seja menor ou, como no presente estudo, comparada com a cabeça femoral, que tem uma carga biomecânica expressiva. Portanto, o efeito do ozônio na sinergia com o ZOL para melhorar as características microestruturais do osso não foi alcançado de forma significativa, mas acreditamos que, em nível celular de resposta reparacional, esses resultados podem ser mais expressivos. Neste contexto, estudos futuros deverão avaliar a nível celular, por meio de análises como a imunohistoquímica, buscando verificar a expressão de proteínas envolvidas no “turnover ósseo” que possa contribuir com o entendimento das terapias analisadas.

Na literatura há poucos relatos de casos de osteonecrose associada a bisfosfonatos em ossos longos, áreas de importante sobrecarga mecânica, como

tíbia e fêmur^{23, 71, 72}. 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 positivo 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.

Compreendendo que o ozônio é uma medicação que atua de forma sistêmica no metabolismo do oxigênio e apresenta efeitos antioxidantes⁷³, 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^{73, 74}. 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.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o ozônio apresenta comportamento sinérgico 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.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Bergstrom U, Jonsson H, Gustafson Y, Pettersson U, Stenlund H, Svensson O, The hip fracture incidence curve is shifting to the right, *Acta Orthop* 80(5) (2009) 520-4.
- [2] Peden M, Global collaboration on road traffic injury prevention, *Int J Inj Contr Saf Promot* 12(2) (2005) 85-91.
- [3] Toroyan T, Peden M.M, Ilaych K, WHO launches second global status report on road safety, *Inj Prev* 19(2) (2013) 150.
- [4] Ramalho-Ferreira, Gabriel et al. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal Of Biomedical Optics*, [s.l.], v. 20, n. 3, 26 mar. 2015. SPIE-Intl Soc Optical Eng.
- [5] Fasola A.O, Nyako E.A, Obiechina A.E, Arotiba J.T, Trends in the characteristics of maxillofacial fractures in Nigeria, *J Oral Maxillofac Surg* 61(10) (2003) 1140-3.
- [6] Iida S, Kogo M, Sugiura T, Mima T, Matsuya T, Retrospective analysis of 1502 patients with facial fractures, *Int J Oral Maxillofac Surg* 30(4) (2001) 286-90.
- [7] R. Laski, V.B. Ziccardi, H.L. Broder, M. Janal, Facial trauma: a recurrent disease? The potential role of disease prevention, *J Oral Maxillofac Surg* 62(6) (2004) 685-8.
- [8] E. Gomez-Barrena, P. Rosset, D. Lozano, J. Stanovici, C. Ermenthaller, F. Gerbhard, Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions, *Bone* 70 (2015) 93-101.
- [9] L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius, Fracture healing under healthy and inflammatory conditions, *Nat Rev Rheumatol* 8(3) (2012) 133-43.
- [10] M.H. Ansari, Maxillofacial fractures in Hamedan province, Iran: a retrospective study (1987-2001), *J Craniomaxillofac Surg* 32(1) (2004) 28-34.

- [11] U.H. Lerner, Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis, *J Dent Res* 85(7) (2006) 584-95.
- [12] J. Compston, Osteoporosis: social and economic impact, *Radiol Clin North Am* 48(3) (2010) 477-82.
- [13] B.R. Chrcanovic, T. Albrektsson, A. Wennerberg, Diabetes and oral implant failure: a systematic review, *J Dent Res* 93(9) (2014) 859-67.
- [14] D. LeRoith, Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Neuroendocrine control of metabolism. Foreword, *Endocrinol Metab Clin North Am* 42(1) (2013) xi-xiii.
- [15] G. Colella, G. Campisi, V. Fusco, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper: Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws-2009 update: the need to refine the BRONJ definition, *J Oral Maxillofac Surg*, United States, 2009, pp. 2698-9.
- [16] S.L. Ruggiero, Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview, *Ann N Y Acad Sci* 1218 (2011) 38-46.
- [17] C.I. Ripamonti, E. Cislighi, L. Mariani, M. Maniezzo, Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study, *Oral Oncol* 47(3) (2011) 185-90.
- [18] H.C. Schwartz, 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(3) (2015) 377.
- [19] V.P. Sivalingam, E. Panneerselvam, K.V. Raja, G. Gopi, Does Topical Ozone Therapy Improve Patient Comfort After Surgical Removal of Impacted Mandibular Third Molar? A Randomized Controlled Trial, *J Oral Maxillofac Surg* 75(1) (2017) 51.e1-51.e9.

- [20] H.O. Kazancioglu, E. Kurklu, S. Ezirganli, Effects of ozone therapy on pain, swelling, and trismus following third molar surgery, *Int J Oral Maxillofac Surg* 43(5) (2014) 644-8.
- [21] S. Stubinger, R. Sader, A. Filippi, The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review, *Quintessence Int* 37(5) (2006) 353-9.
- [22] A.M. Elvis, J.S. Ekta, Ozone therapy: A clinical review, *J Nat Sci Biol Med* 2(1) (2011) 66-70.
- [23] K.Y. Huang, R.S. Yang, C.C. Hsieh, Simultaneous osteonecrosis and osteomyelitis in a patient with cancer of the breast, *J Bone Joint Surg Br* 91(9) (2009) 1249-51.
- [24] K.E. Toker H. Özdemir H., Ö. H., The Effects of Allograft Combined with Ozone Therapy on Regeneration of Calvarial Defects in Rats., 2016;, pp. 205-213.
- [25] Gonenci R, Tabur M, Ozsoy SY , Preventive and Curative Effects of Medical Ozone in Rats Exposed to Experimental Osteomyelitis., 2017, pp. 355-359.
- [26] H. Ozdemir, H. Toker, H. Balci, H. Ozer, Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats, *J Periodontal Res* 48(6) (2013) 722-6.
- [27] S.K. Buyuk, S.I. Ramoglu, M.F. Sonmez, The effect of different concentrations of topical ozone administration on bone formation in orthopedically expanded suture in rats, *Eur J Orthod* 38(3) (2016) 281-5.
- [28] H.O. Kazancioglu, S. Ezirganli, N. Demirtas, Comparison of the influence of ozone and laser therapies on pain, swelling, and trismus following impacted third-molar surgery, *Lasers Med Sci* 29(4) (2014) 1313-9.
- [29] Resolução 2.181 do conselho federal de Medicina Abril de 2018, que define a terapia com ozônio como experimental e só pode ser usado em procedimentos clínicos dentro dos protocolos do sistema CEP-Conep e Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

- [30] S.D. Ibrahim Gokhan Duman , Hasan Gokce , Ramazan Gonenci , Raif Özden , Vedat Uruc, Effects of Gaseous Ozone Treatment on Bone Regeneration in Femoral Defect Model in Rats, 2017, pp. 7-12.
- [31] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health.
- [32] M.L. Bouxsein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Muller, Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography, *J Bone Miner Res* 25(7) (2010) 1468-86.
- [33] E.R. Luvizuto, T.P. Queiroz, S.M. Dias, T. Okamoto, R.C. Dornelles, I.R. Garcia, Jr., R. Okamoto, Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene, *Arch Oral Biol* 55(1) (2010) 52-9.
- [34] E.R. Luvizuto, S.S. Dias, T. Okamoto, R.C. Dornelles, R. Okamoto, Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats, *Arch Oral Biol* 56(10) (2011) 984-90.
- [35] G. Ramalho-Ferreira, L.P. Faverani, G.A.C. Momesso, E.R. Luvizuto, I. de Oliveira Puttini, R. Okamoto, Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats, *Clin Oral Investig* 21(5) (2017) 1485-1494.
- [36] M. Bienz, F. Saad, Management of bone metastases in prostate cancer: a review, *Curr Opin Support Palliat Care* 9(3) (2015) 261-7.
- [37] C.H. Van Poznak, S. Temin, G.C. Yee, N.A. Janjan, W.E. Barlow, J.S. Biermann, L.D. Bosserman, C. Geoghegan, B.E. Hillner, R.L. Theriault, D.S. Zuckerman, J.H. Von Roenn, American Society of Clinical Oncology executive summary of the clinical practice guideline update on the role of bone-modifying agents in metastatic breast cancer, *J Clin Oncol* 29(9) (2011) 1221-7.]

- [38] T.L. Aghaloo, B. Kang, E.C. Sung, M. Shoff, M. Ronconi, J.E. Gotcher, O. Bezouglaia, S.M. Dry, S. Tetradis, Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat, *J Bone Miner Res* 26(8) (2011) 1871-82.
- [39] P. Barba-Recreo, J.L. Del Castillo Pardo de Vera, T. Georgiev-Hristov, E. Ruiz Bravo-Burguillos, A. Abarrategi, M. Burgueno, M. Garcia-Arranz, Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model, *J Craniomaxillofac Surg* 43(7) (2015) 1161-8.
- [40] P. Barba-Recreo, J.L. Del Castillo Pardo de Vera, M. Garcia-Arranz, L. Yebenes, M. Burgueno, Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats, *J Craniomaxillofac Surg* 42(6) (2014) 744-50.
- [41] M. Cankaya, F. Cizmeci Senel, M. Kadioglu Duman, E. Muci, E.H. Dayisoğlu, F. Balaban, 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(9) (2013) 1134-9.
- [42] E.H. Dayisoğlu, C. Ungor, E. Tosun, S. Ersoz, M. Kadioglu Duman, F. Taskesen, F.C. Senel, Does an alkaline environment prevent the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw? An experimental study in rats, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 117(3) (2014) 329-34.
- [43] E.H. Dayisoğlu, F.C. Senel, C. Ungor, E. Tosun, M. Cankaya, S. Ersoz, F. Taskesen, The effects of adjunctive parathyroid hormone injection on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an animal study, *Int J Oral Maxillofac Surg* 42(11) (2013) 1475-80.
- [44] H.W. Jang, J.W. Kim, I.H. Cha, Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ), *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 37(1) (2015) 18.
- [45] G. Mergoni, P. Vescovi, R. Sala, E. Merigo, P. Passerini, R. Maestri, D. Corradi, P. Govoni, S. Nammour, M.G. Bianchi, The effect of laser therapy on the

expression of osteocalcin and osteopontin after tooth extraction in rats treated with zoledronate and dexamethasone, *Support Care Cancer* 24(2) (2016) 807-813.

[46] V.N. Pacheco, R. Langie, A. Etges, D. Ponzoni, E. Puricelli, Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats - a blind randomized controlled trial, *Int J Exp Pathol* 96(4) (2015) 255-60.

[47] F.C. Senel, M. Kadioglu Duman, E. Muci, M. Cankaya, A.A. Pampu, S. Ersoz, O. Gunhan, Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109(3) (2010) 385-91.

[48] R. Florencio-Silva, G.R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simoes, P.S. Cerri, Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells, *Biomed Res Int* 2015 (2015) 421746.

[49] E. Ervolino, C. Statkiewicz, L.F. Toro, J.M. de Mello-Neto, T.P. Cavazana, J.P.M. Issa, R.C.M. Dornelles, J.M. de Almeida, M.J.H. Nagata, R. Okamoto, C.A. Casatti, V.G. Garcia, L.H. Theodoro, Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate, *Bone* 120 (2019) 101-113.

[50] C. Statkiewicz, L.F. Toro, J.M. de Mello-Neto, D.P. de Sa, C.A. Casatti, J.P.M. Issa, L.T.A. Cintra, J.M. de Almeida, M.J.H. Nagata, V.G. Garcia, L.H. Theodoro, E. Ervolino, Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats, *J Photochem Photobiol B* 184 (2018) 7-17.

[51] L.F. Toro, J.M. de Mello-Neto, F. Santos, L.C. Ferreira, C. Statkiewicz, L.T.A. Cintra, J.P.M. Issa, R.C.M. Dornelles, J.M. de Almeida, M.J.H. Nagata, V.G. Garcia, L.H. Theodoro, C.A. Casatti, E. Ervolino, Application of Autologous Platelet-Rich Plasma on Tooth Extraction Site Prevents Occurrence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws in Rats, *Sci Rep* 9(1) (2019) 22.

- [52] H. Yang, H. Pan, F. Yu, K. Chen, G. Shang, Y. Xu, A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats, *Int J Clin Exp Pathol* 8(5) (2015) 5161-7.
- [53] M. Shiraki, S. Tanaka, H. Suzuki, S. Ueda, T. Nakamura, Safety, pharmacokinetics, and changes in bone metabolism associated with zoledronic acid treatment in Japanese patients with primary osteoporosis, *J Bone Miner Metab* 35(6) (2017) 675-684.
- [54] Y. Hao, X. Wang, L. Wang, Y. Lu, Z. Mao, S. Ge, K. Dai, Zoledronic acid suppresses callus remodeling but enhances callus strength in an osteoporotic rat model of fracture healing, *Bone* 81 (2015) 702-711.
- [55] D.K. Khajuria, R. Vasireddi, M. Trebbin, D. Karasik, R. Razdan, 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 (2017) 698-708.
- [56] C. Olejnik, G. Falgayrac, A. During, B. Cortet, G. Penel, Doses effects of zoledronic acid on mineral apatite and collagen quality of newly-formed bone in the rat's calvaria defect, *Bone* 89 (2016) 32-39.
- [57] M. Turker, A. Aslan, M. Cirpar, A. Kochai, O.B. Tulmac, M. Balci, Histological and biomechanical effects of zoledronate on fracture healing in an osteoporotic rat tibia model, *Eklemler Hastalik Cerrahisi* 27(1) (2016) 9-15.
- [58] L.F. Toro, Avaliação do potencial osteogênico da terapia fotodinâmica em ratas com os principais fatores de risco para a osteonecrose dos maxilares, in: E. Ervolino (Ed.) *Repositório Institucional Unesp*, 2019.
- [59] 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.
- [60] 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.

[61] STAVROPOULOS, A.; BERTL, 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.

[62] KHAN, A. A.; MORRISON, A.; HANLEY, D. A.; FELSENBURG, 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

[63] 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.

[64] 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.

[65] 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.

[66] 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.

[67] 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.

[68] 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.

[69] 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.

[70] 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.

[71] 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.

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

[73] 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

[74] 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.

ANEXOS

Anexo I – Certificado de aprovação da Comissão 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.


Profa. Ass. Dra. Maria Gisela 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, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br