



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

MÔNICA CAROLINE DE SOUZA

**Osteogênese periimplantar em função da ozonioterapia na
osteoporose induzida em ratas**

Araçatuba

2022

MÔNICA CAROLINE DE SOUZA

Osteogênese periimplantar em função da ozonioterapia na osteoporose induzida em ratas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba

2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter me sustentado até aqui com seu grande amor, bondade e misericórdia.

À minha família, em especial à minha mãe Ivanir e minha avó Nair por serem meu porto seguro, me dando todo amor e suporte necessário no decorrer do curso, e por sempre acreditarem no meu potencial. Ao meu amado esposo Willian, que sempre me apoiou e incentivou incessantemente. Tudo é por vocês!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara, bem como todos os professores e demais funcionários que passaram pela minha jornada na Universidade, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani por todas as oportunidades que me concedeu e por todos os ensinamentos. Aos alunos de Iniciação Científica e Pós-graduandos que trabalharam incansavelmente para que esse projeto fosse finalizado, em especial ao William Phillip, por toda ajuda e suporte durante a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do qual fui bolsista PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica), e que foi de fundamental importância para a realização deste estudo.

Ao meu atual orientador de Iniciação Científica, Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção, pelas oportunidades e por ter me acolhido tão bem nos meus 2 últimos anos de graduação, bem como a Cecília e Lillian. O bom resultado de uma equipe é fruto do comprometimento de todos os membros.

A todos os amigos que fiz ao longo da graduação, que tornaram a caminhada muito mais leve e feliz. Às minhas colegas de apartamento Monique, Juliana e Stéfani, por terem compartilhado a casa e a vida comigo durante esses anos.

SOUZA, M. C. **Osteogênese periimplantar em função da ozonioterapia na osteoporose induzida em ratas**. 2022. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Devido às suas propriedades, a ozonioterapia surge como um método interessante para a análise do reparo ósseo periimplantar, principalmente em ossos de baixa densidade, onde procura-se diminuir a taxa de insucesso dos implantes ósseo-integráveis. O objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito da ozonioterapia no reparo ósseo periimplantar em ratas submetidas à indução de osteoporose. Para tal, foram utilizadas 10 ratas, adultas, com 6 meses de idade. Após o procedimento de ovariectomia bilateral e uma espera de 90 dias para a indução da osteoporose, foi realizada a cirurgia para instalação dos implantes, sendo que cada animal teve 1 implante instalado em uma de suas tíbias. O tratamento teste (OVX OZ) foi realizado com a aplicação intraperitoneal do ozônio em concentração de 0.7mg/kg, nos períodos: PO imediato, 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º dia pós-operatório. O controle (OVX SAL) foi realizado a aplicação intraperitoneal de 1ml de solução salina, nos mesmos períodos. Os tempos de eutanásia foram aos 14 e 42 dias para análises histométrica e imunohistoquímica. Ao analisar a extensão linear de contato osso e implante (ELCOI) e área de osso neoformado (AON), houve significância estatística apenas aos 14 dias ($p < 0,05$) com maiores valores para OVX OZ. Na comparação intragrupo OVX OZ, entre 14 e 42 dias, não houve significância estatística. Já na comparação intragrupo SAL, entre 14 e 42 dias, houve diferença estatística significativa, tanto para ELCOI como para AON. O anticorpo contra osteocalcina, no período de 14 dias apresentou score 2 (marcação moderada) para o grupo OVX OZ, e score 1 (leve) para o grupo OVX SAL. Aos 42 dias apresentou marcação moderada para os grupos OVX OZ e OVX SAL. A ozonioterapia modifica positivamente o mecanismo biológico de reparo nos períodos iniciais, através da liberação de fatores de crescimento no citoplasma. Alguns são osteoindutores, agindo nas células osteoprogenitoras, diferenciando-as e auxiliando na osteogênese. Dessa forma, concluiu-se que, a ozonioterapia favoreceu o reparo ósseo periimplantar nos estágios iniciais.

Palavras-chave: Ozônio. Osteoporose. Implantação Dentária Endo-Óssea.

SOUZA, M. C. **Peri-implant osteogenesis as a function of ozone therapy in induced osteoporosis in rats.** 2022. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Due to its properties, ozone therapy appears as an interesting method for the analysis of peri-implant bone repair, especially in low-density bones, where the aim is to reduce the rate of bone-integrating implants. objective of the present study analyzed the effect of therapy on peri-implant bone repair in peri-implant rats the effect of inducing osteoporosis. For this, 10 rats, adults, with 6 months of age were used. After the bilateral ovariectomy procedure and a 90-day wait for the induction of osteoporosis, a surgery was performed to install the implants, and each animal had 1 implant in one of its installed tibias. The test treatment (OVX OZ) was performed with an intraperitoneal application of ozone at a concentration of 0.7mg/kg, in the following periods: immediate PO, 2nd, 4th, 6th, 8th, 10th, 12th postoperative day. The control (OVX SAL) was performed with an intraperitoneal application of 1 ml of saline solution, in the same periods. Euthanasia times were at 14 and 42 days for histometric and immunohistochemical examinations. When analyzing the linear extent of bone-implant contact (ELCOI) and area of newly formed bone (AON), there was statistical significance only at 14 days ($p<0.05$) with higher values for OVX OZ. In the intragroup comparison OVX OZ, between 14 and 42 days, there was statistical significance. In the intragroup comparison SAL, between 14 and 42 days, there was a statistically significant difference, both for ELCOI and for AON. The antibody against osteocalcin, in the period of 14 days, presented score 2 (moderate marking) for the OVX OZ group, and score 1 (mild) for the OVX SAL group. At 42 days, it showed marking for the OVX OZ and OVX SAL groups. Ozone therapy positively modifies the biological repair mechanism in the first periods, through the measurement of growth factors in the cytoplasm. Some are osteoinductive, stimulating osteoprogenitor cells, differentiating them as an aid in osteogenesis. Thus, it was concluded that ozone therapy favored peri-implant bone repair in the early years.

Keywords: Ozone. Osteoporosis. Endosseous Dental Implantation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 PROPOSIÇÃO	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 Animais: desenho experimental	9
3.1.1 Ovariectomia bilateral	10
3.1.2 Instalação dos implantes	11
3.1.3 Tratamento	12
3.1.4 Eutanásia	12
3.2 Procedimento laboratorial para tecidos descalcificados	13
3.2.1 Análise histológica.....	13
3.2.2 Análise imunohistoquímica.....	13
3.3 Análise estatística	14
4 RESULTADOS	15
4.1 Análise histológica.....	15
4.2 Análise imunohistoquímica	17
5 DISCUSSÃO	19
6 CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
ANEXO – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	29

1 INTRODUÇÃO

A massa óssea no esqueleto depende das atividades coordenadas de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, que são responsáveis pela formação, reabsorção, e mineralização óssea, respectivamente. As atividades dessas células, por sua vez, são controladas por uma variedade de hormônios e citocinas, bem como por carga mecânica. Tendo em vista que o complexo implante/tecido ósseo periimplantar será submetido às oscilações térmicas, mecânicas e químicas constantemente, o tecido ósseo precisa estar em condições favoráveis para que a osseointegração aconteça. A texturização de superfície dos implantes é um método que busca aumentar a resistência mecânica e favorecer a osseointegração, atraindo células da linhagem osteoblástica de maneira mais rápida e eficaz. Apesar dos progressos no campo dos biomateriais ortopédicos metálicos, a integração do osso hospedeiro e do implante ainda necessita de melhorias para reduzir o tempo de cicatrização e aumentar a vida útil do implante, em especial em regiões de menor densidade de tecido ósseo.¹

Os hormônios sexuais são muito importantes para manter o tecido ósseo em equilíbrio, e a falta de estrogênio ou testosterona leva à diminuição da massa óssea e ao aumento do risco de osteoporose. A falta de estrogênio leva a um aumento no número de unidades multicelulares ósseas e ao desacoplamento da formação e reabsorção óssea, resultando em muito pouco osso depositado pelos osteoblastos em comparação com a quantidade de osso reabsorvida pelos osteoclastos. Essa desordem no metabolismo ósseo acontece principalmente em mulheres na fase pós-menopausa, em que há uma diminuição significativa do fornecimento de estrogênio.^{2,3}

Devido às suas propriedades, a ozonioterapia surge como um método interessante para a análise do reparo ósseo periimplantar, principalmente em ossos de baixa densidade, onde procura-se diminuir a taxa de insucesso dos implantes ósseo-integráveis. Dentre os benefícios da ozonioterapia, destaca-se a melhoria da circulação sanguínea (microcirculação e periférica), tecidual e metabolismo como um todo. O ozônio também melhora a capacidade de transporte de oxigênio no sangue, regula as enzimas antioxidantes e as respostas das células do sistema imunológico.

Ainda estimula a angiogênese e a formação de fibroblastos, aumenta a liberação de fatores de crescimento das plaquetas e acelera a troca de prótons e

elétrons após a dissolução no plasma, reativando o metabolismo em todo o corpo. Além das propriedades de reparo hemostático, a ozonioterapia tem ação bactericida, virucida, fungicida, efeito analgésico e desintoxicante.^{4,5}

Suas vias de administração incluem: sistêmica (intraperitoneal, endovenosa, retal) ou tópica. O veículo utilizado pode ser gás ou solução aquosa (óleo, água, sangue). Na literatura, vários estudos vêm mostrando que o ozônio, em especial a água ozonizada, atua muito bem na desinfecção e cicatrização de feridas, seja em intervenções cirúrgicas, periodontais ou endodônticas. A aplicação endovenosa do ozônio também tem sido um potencializador de medicamentos antivirais no tratamento contra a COVID-19, reduzindo a inflamação e danos pulmonares.^{6,7}

Dessa forma, a ozonioterapia surge como uma nova estratégia terapêutica que, além de atuar em tecidos moles, pode estimular e acelerar o reparo ósseo.^{8,9} Sendo assim, ossos caracterizados pela osteoporose experimental categorizam-se como um modelo muito interessante para estudos referentes aos efeitos da ozonioterapia, tanto para a verificação da influência do ozônio no reparo ósseo periimplantar, bem como para o comportamento biológico da cicatrização óssea.^{10,11} É importante ressaltar que, diante dos nossos conhecimentos, não há publicações semelhantes, isto é, trata-se de um estudo insólito.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste projeto foi analisar o potencial da ozonioterapia no reparo ósseo periimplantar em ratas submetidas à indução de osteoporose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 10 implantes de liga Ti-6Al-4V com superfície texturizada por duplo ataque ácido (ácidos nítrico, fluorídrico e sulfúrico). As dimensões dos implantes foram: diâmetro de 2,0 mm e altura de 6,0 mm, esterilizados por raios gama. Para a aplicação da ozonioterapia, foi utilizado o aparelho fornecido pela empresa OZONE&LIFE INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SISTEMAS LTDA (São José dos Campos – SP), em que realizou-se 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: PO imediato, 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º dia pós-operatório.^{12,13}

3.1 Animais: desenho experimental

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 enviado para parecer do Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e, somente após a aprovação e obtenção do parecer consubstanciado (nº 00431-2018), teve início a pesquisa.

Para o estudo, foram utilizadas 10 ratas (*Rattus norvegicus albinus* Wistar), fêmeas, adultas, com 6 meses de idade, com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição. O número de animais por grupo foi determinado a partir do cálculo do Poder do Teste no website http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/qua_2_medias.html. Para tal, 5 ratas foram submetidas a eutanásia em 14 dias (3 OVX SAL e 2 OVX OZ) e 5 ratas em 42 dias (3 OVX SAL e 2 OVX OZ).

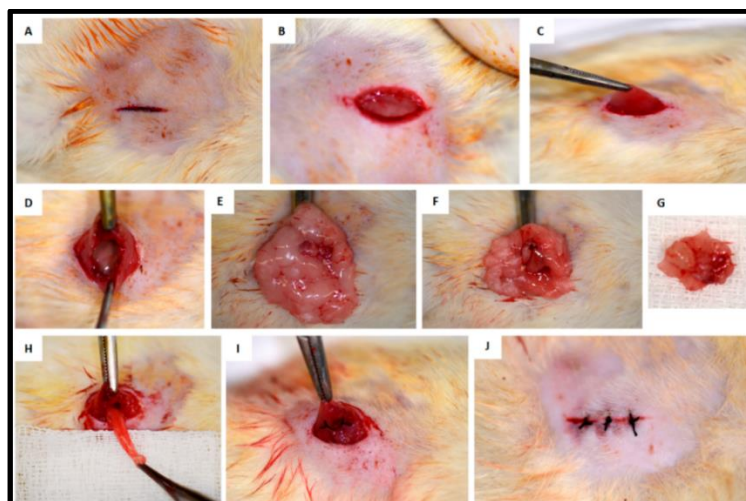
Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas, num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água *ad libitum*, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos. As 10 ratas foram submetidas ao procedimento de ovariectomia bilateral (OVX).¹⁴⁻¹⁸

3.1.1 Ovariectomia bilateral

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) na dose de 50 mg/kg do animal e Cloridrato de quetamina (Ketamina, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) na dose de 5 mg/kg do animal e a seguir, as ratas foram imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral. Foi feita uma incisão de 1,5 cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio afim 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 (Vicryltm – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Feito isso, foi realizada a remoção dos ovários. Finalizado, suturou-se por planos, com fio de Poliglactina também (Figura 1).

Nos primeiros oito dias, após a ambientação, que corresponde a 2 ciclos estrais regulares (ciclo estrogênio), as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal, de acordo com técnica descrita em estudos prévios.¹⁹⁻²¹ 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.

Figura 1 – Foto da sequência do trans-operatório do procedimento 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.



Fonte: Autor, 2019.

3.1.2 Instalação dos implantes

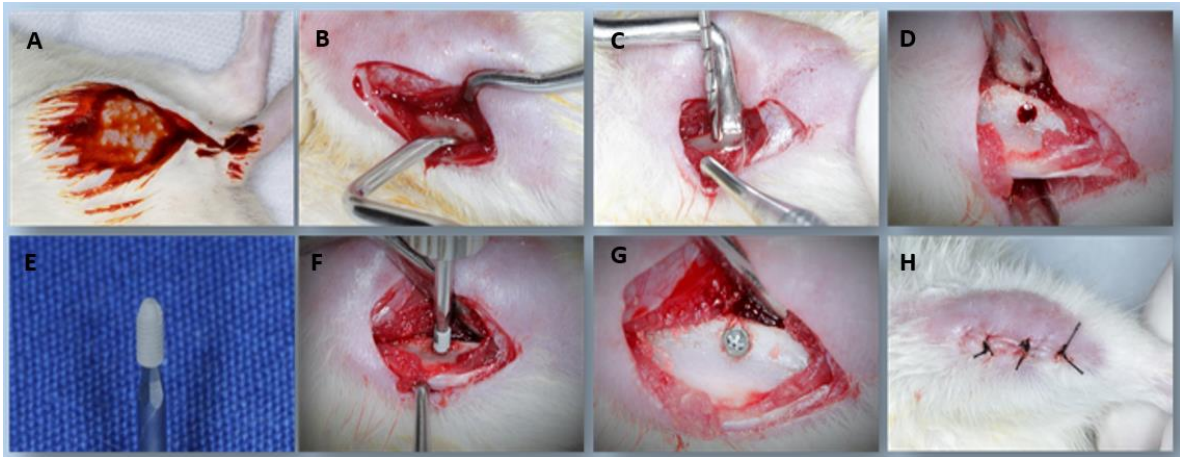
Após 90 dias de espera para indução da osteoporose nas ratas, todos os animais, após jejum durante 12 horas previas ao procedimento cirúrgico, foram sedados pela combinação de 50mg/kg de ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais, foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany), com travamento e estabilidade inicial (Figura 2).

Cada animal recebeu 1 implante com texturização de duplo ataque ácido na metáfise tibial escolhida de forma aleatória. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

Figura 2 - Sequência cirúrgica para a instalação de implantes nas tíbias das ratas. (A) Tricotomia seguida de antissepsia com PVPI; (B) Acesso cirúrgico à metáfise tibial; (C) e (D) Procedimento cirúrgico de preparação da tíbia para instalação dos implantes e leito ósseo receptor do implante; (E) Implante com as dimensões de 2 mm x 6 mm; (F)

Instalação do implante com a chave digital; (G) Implante instalado na tíbia do animal; (H) Sutura por planos anatômicos.



Fonte: Autor, 2019.

3.1.3 Tratamento

Os grupos experimentais em função da indução da osteoporose foram determinados em dois grupos: o **grupo 1 (OVX OZ)** foi realizada a aplicação intraperitoneal do ozônio em concentração de 0.7mg/kg, armazenado em uma seringa descartável de 30ml com agulha de calibre 25mm x 0,07mm, nos períodos: PO imediato, 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º dia pós-operatório. O **grupo 2 (OVX SAL)** foi realizada a aplicação intraperitoneal de 1ml de solução salina, através de uma seringa de 5ml descartável com agulha de calibre 25mm x 0,07mm, como grupo controle, nos períodos: PO imediato, 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º dia pós-operatório. A ozonioterapia foi realizada através do gerador de ozônio (OZONE&LIFE INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SISTEMAS LTDA - São José dos Campos – SP).¹³

3.1.4 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia no período de 14 e 42 dias após a cirurgia de instalação dos implantes (3 ratas do grupo controle e 2 ratas do grupo teste foram submetidos à eutanásia em 14 dias, as outras 3 ratas controle e 2 ratas testes, em 42 dias), através de sobredosagem anestésica (Tiopental Sódico, 150 mg/kg, pela via intraperitoneal).

3.2 Procedimento laboratorial para tecidos descalcificados

3.2.1 Análise histológica

Logo após à eutanásia, os animais tiveram as tíbias com os implantes instalados fixadas em formol e sofreram descalcificação em EDTA (10%). Assim, as peças foram desidratadas numa sequência de álcoois. Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina. Feita a inclusão, os implantes foram removidos por movimento anti-horário com chave digital hexagonal 1,2 mm. Após a remoção dos implantes, as peças foram incluídas em parafina novamente para obtenção de corte com 5 µm de espessura e montados em lâminas. 2 lâminas de cada grupo, após a microtomia, foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE), sendo analisada a cronologia do reparo ósseo na interface osso/implante, 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.

3.2.2 Análise imunohistoquímica

Após a descalcificação dos tecidos periimplantares e confecção das lâminas histológicas, para as reações de imunoistoquímica, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). O anticorpo primário utilizado foi contra osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de analisar as respostas celulares quanto ao processo de mineralização.

Foi utilizado o anticorpo secundário biotinizado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para o anticorpo utilizado, foi avaliada a expressão das proteína semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo alveolar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representaram: ausência de marcação (0); marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), em que foram consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-

se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade do anticorpo.

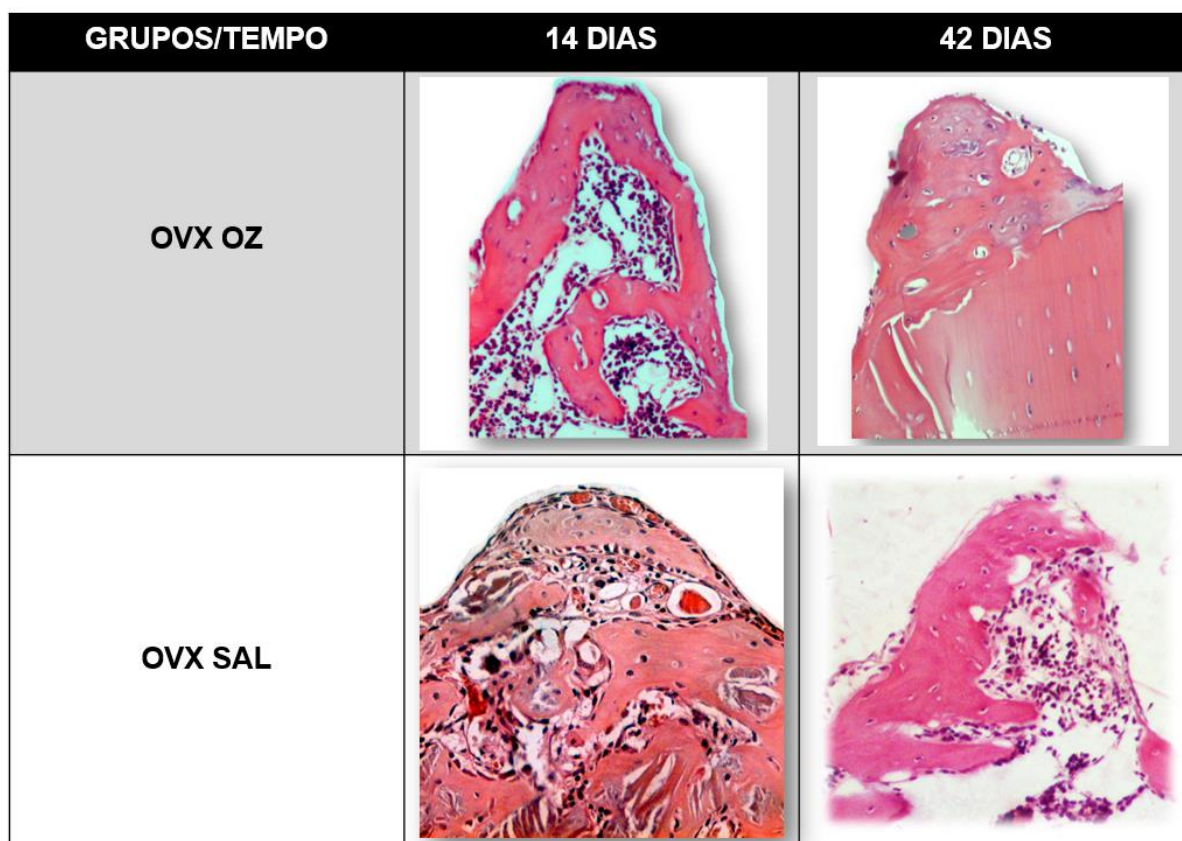
3.3 Análise estatística dos resultados

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos obtidos, os dados foram coletados e submetidos à análise estatística através do software SigmaPlot 12.0 (Exact Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA). Os resultados obtidos pela histometria dos tecidos descalcificados (ELCOI e AON) foram submetidos aos testes Shapiro-Wilk e ANOVA um fator, com valor de significância de $p < 0,05$. Para a imunohistoquímica não foi realizada análise estatística, apenas por score.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

Figura 3 – Imagens histológicas (coloração HE) obtidas em microscópio óptico, com aumento de 25x.



Fonte: Autor, 2020.

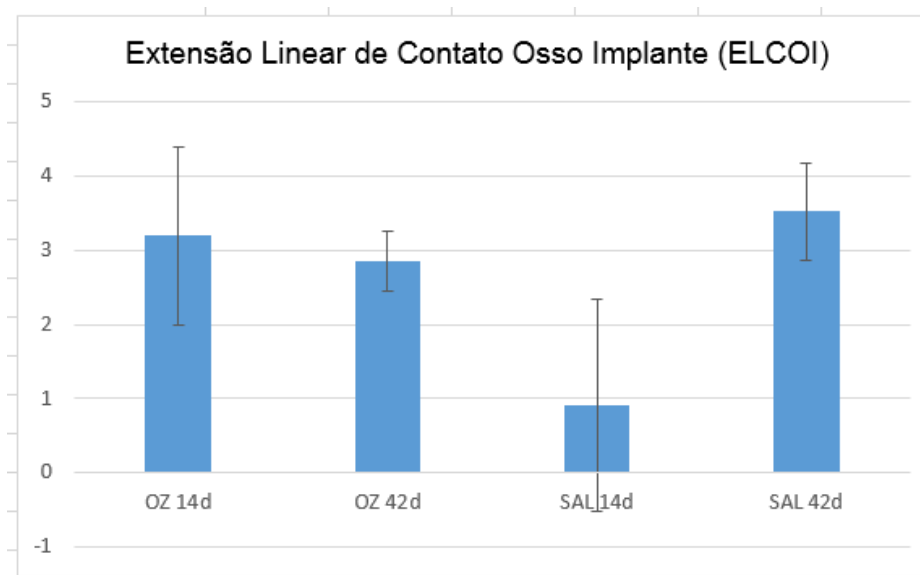
Os valores médios de extensão linear de contato entre osso e implante - ELCOI na região medular em milímetros para o grupo OVX OZ no tempo de 14 dias foi de $3,26 \pm 1,2$ (mm), com um total de 84% de formação óssea em contato com o implante. Aos 42 dias para o grupo OVX OZ $2,85 \pm 0,39$ (mm) com um total de 84% de formação óssea. Na análise estatística em comparação aos tempos de 14 e 42 dias para o grupo OVX OZ, não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,502$).

Para o grupo OVX SAL, aos 14 dias a extensão linear de contato entre osso e implante apresentou um valor de $0,9 \pm 1,42$ (mm), com um total de 16% de formação óssea em contato com o implante. Aos 42 dias apresentou um valor de $3,52 \pm 0,66$ (mm), um total de 82% de formação óssea em contato com o implante. Ao comparar

os tempos de 14 e 42 dias para o grupo OVX SAL, houve uma diferença significativamente estatística ($p = 0,001$).

A comparação entre os grupos OVX OZ e OVX SAL no tempo de 14 dias apresentou uma diferença estatística ($p = 0,001$), e para o tempo de 42 dias não apresentou diferença estatística ($p = 0,28$).

Gráfico 1 – Imagem gráfica da extensão linear de contato osso e implante para os grupos experimentais, nos tempos de 14 e 42 dias.



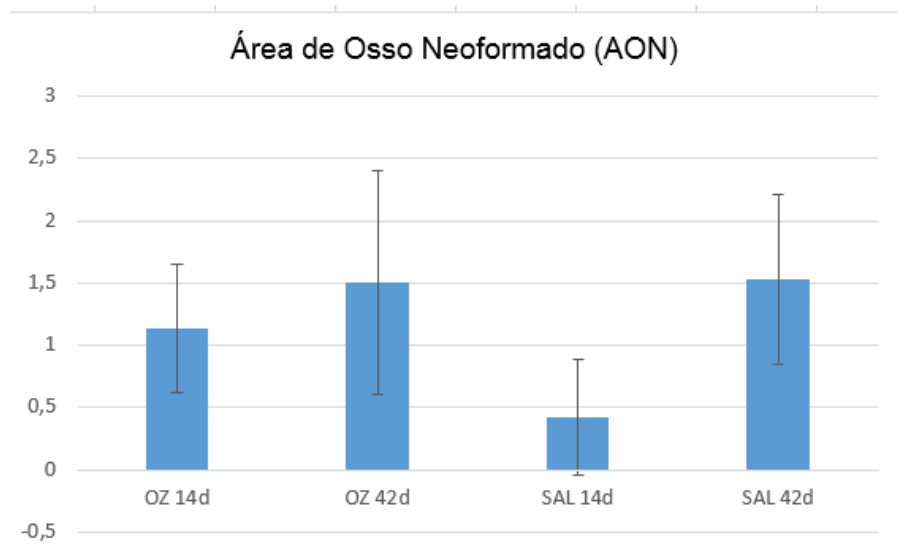
Fonte: Autor, 2020.

Para a análise da Área de Osso Neoformado (AON), o grupo OVX OZ 14 dias apresentou um resultado em milímetros quadrados (mm^2) de $1,13 \pm 0,51$, com uma porcentagem de 51,02% de área de osso neoformado. Aos 42 dias para o grupo OVX OZ, apresentou $1,5 \pm 0,9$ (mm^2), um total de 71,42% de osso neoformado. Ao comparar os períodos de 14 e 42 dias para o grupo OVX OZ, não apresentou uma diferença estatística ($p = 0,34$).

Para o grupo OVX SAL, aos 14 dias apresentou uma área de formação óssea de $0,42 \pm 0,46$ (mm^2), totalizando 19,24% de área. Aos 42 dias os resultados foram de $1,53 \pm 0,68$ (mm^2), totalizando 65,79% de área de osso neoformado. Na comparação entre os tempos de 14 e 42 dias para o grupo OVX SAL houve uma diferença estatística significativa ($p = 0,005$).

A comparação dos grupos OVX OZ e OVX SAL não apresentou diferença estatística no período de 14 dias ($p = 0,05$) e no período de 42 dias ($p = 0,93$).

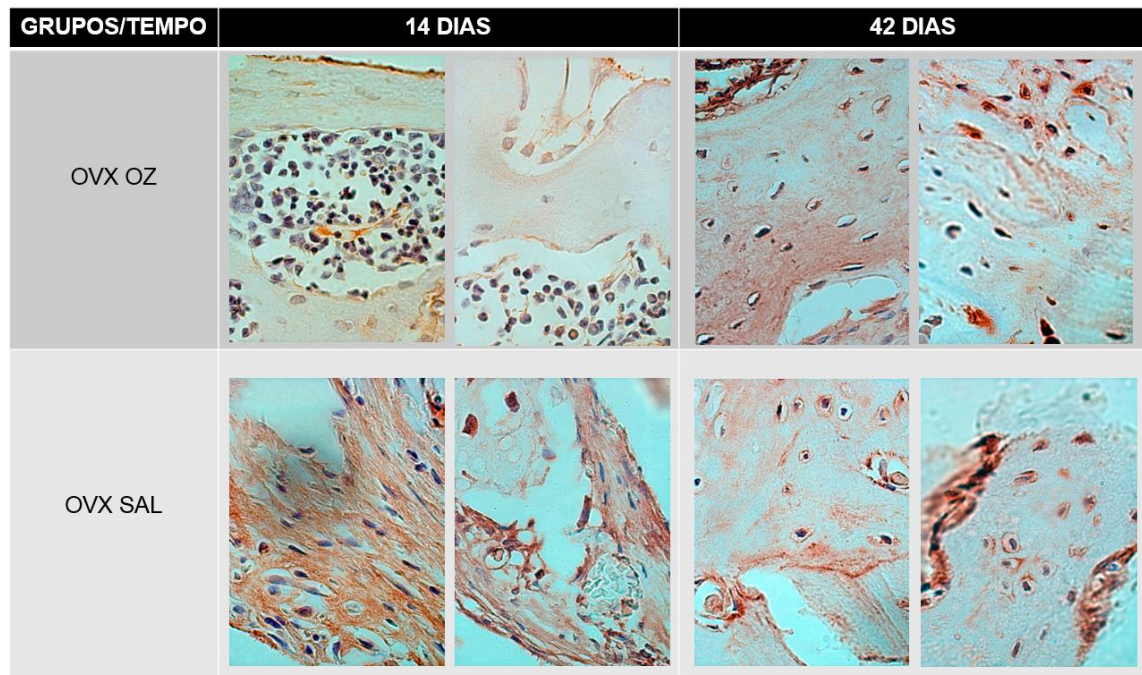
Gráfico 2 – Imagem gráfica da área de osso neoformado para os grupos experimentais, nos tempos de 14 e 42 dias.



Fonte: Autor, 2020.

4.2 Análise Imunohistoquímica

Figura 4 – Células imunomarcadas no processo de reparo alveolar.



Fonte: Autor, 2021.

O anticorpo contra osteocalcina, no período de 14 dias apresentou score 2 (marcação moderada) para o grupo OZ, e score 1 (leve) para o grupo SAL. Aos 42 dias apresentou marcação moderada para os grupos OZ e SAL.

5 DISCUSSÃO

Partindo do mecanismo biológico, nas primeiras 48 horas após a lesão, diferentes células do sistema imunológico como neutrófilos, monócitos e linfócitos atuam juntas para prevenir o sangramento e remover os tecidos mortos para equilibrar o processo inflamatório e fazer o reparo adequado da ferida. Nos próximos 2 a 10 dias, a formação de novos tecidos é seguida por meio da proliferação celular e migração de diferentes tipos de células, como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Nesse estágio, os fibroblastos desempenham papéis muito importantes na formação de novos tecidos. A ferida atrairá quantidade de fibroblastos para os locais da lesão para facilitar a cicatrização.²² Sendo assim, após os 10 dias, cessado o mecanismo biológico de reparo, haverá a maturação do tecido e diferenciação em células da linhagem osteoblástica (mecanismo normal), ou seja, neoformação óssea, como observado em todos os grupos aos 14 dias. Neste período, ao analisarmos os grupos OVX SAL e OVX OZ, nota-se que há diferença estatística significativa em relação à área de osso neoformado, mostrando maior formação óssea para o grupo experimental. Isso se dá pelo fato de que o ozônio modifica positivamente o mecanismo biológico de reparo, ou seja, além de estimular a liberação de fibroblastos, esta nova modalidade terapêutica está relacionada com a melhora da circulação sanguínea e transporte de oxigênio no sangue.⁵ Dentre os principais componentes do sangue, estão: plasma (parte líquida); glóbulos brancos (leucócitos e plaquetas); glóbulos vermelhos (hemáceas). Os leucócitos conferem resistência aos agentes infecciosos, já as plaquetas sofrem degranulação liberando fatores de crescimento em locais onde há lesão. O ozônio aumenta a liberação de fatores de crescimento no plasma, que promovem a diferenciação e a maturação das células, o que varia entre os fatores de crescimento, que vão agir como sinalizadores. Alguns são osteoindutores, agindo nas células osteoprogenitoras, diferenciando-as e auxiliando na osteogênese.^{23,24}

Na comparação intragrupo OVX OZ, tanto para ELCOI como para AON, não há diferença estatística significativa entre 14 e 42 dias, indicando similaridade quanto à neoformação óssea e mostrando mais uma vez a influência da ozonioterapia no mecanismo biológico de reparo em períodos iniciais. Já para OVX SAL, há diferença estatística, pois não há similaridade quanto à neoformação óssea, isto é, sem a aplicação de ozônio, a formação óssea é muito pequena aos 14 dias, comparado aos

42 dias. A ausência de diferença estatística entre OVX OZ e OVX SAL aos 42 dias, mostra que, nos períodos tardios, a ozonioterapia não tem influência. Ademais, em relação à imunohistoquímica, a marcação moderada (score 2) do anticorpo contra osteocalcina para OVX OZ 14 também mostra maior atividade de reparo ósseo, quando comparado à OVX SAL 14, que apresentou marcação leve (score 1). Em contrapartida, aos 42 dias há similaridade dos grupos, apresentando marcação moderada (score 2). Na literatura, varios estudos comprovam que a ozonioterapia age nos períodos iniciais do reparo ósseo, não sendo possível ver sua efetividade em períodos tardios.^{9,10,25}

Matsamura, Ikumi, Nakajima²⁶ tratou implantes com ozônio e descobriu que havia regeneração de células periodontais semelhante àquela ao redor dos dentes naturais. Assim como em outro estudo realizado, em tíbias de coelhos após terapia imunossupressora com Ciclosporina A, que demonstrou que o ozônio tem uma influência na densidade óssea e na qualidade do osso periimplantar, sendo uma alternativa eficaz em situações em que há alteração metabólica significativa decorrente do uso de medicamentos ou oriundos do próprio organismo, como a osteoporose.²⁷ Sabe-se que o ozônio reage com os componentes do sangue (eritrócitos, plaquetas, leucócitos e células endoteliais) e induz o metabolismo do oxigênio, a energia celular, as alterações imunomodulatórias, o sistema de defesa antioxidante e a microcirculação nos tecidos. Tais efeitos se assemelham à propriedade bioestimulante da laserterapia, amplamente estudada.²⁸ Chagas *et al.*²⁹ utilizaram a ozonioterapia e a laserterapia no tratamento de ferida em porcos-espinhos. Os resultados da utilização da ozonioterapia isolada ou associada a laserterapia, mostraram que o emprego dessas técnicas auxiliou no processo cicatricial, com diminuição do processo inflamatório e aceleração do crescimento tecidual. Sendo assim, é relevante se pensar em novos protocolos e tempos de aplicação do ozônio, bem como sua associação com outros métodos, como a laserterapia, no reparo ósseo periimplantar.

De acordo com a literatura, há uma necessidade da realização de mais estudos, buscando evidências sólidas e concisas do efeito da ozonioterapia na cicatrização e no reparo ósseo, antes da sua utilização clínica.^{30,31} O que se sabe é que a aplicação sistêmica de ozônio no pós-operatório a longo prazo pode acelerar a cicatrização

óssea.²⁵ Dessa forma, os dados obtidos em nosso estudo, colaboram com o entendimento sobre o efeito da ozonioterapia no reparo ósseo.

6 CONCLUSÃO

A ozonioterapia favoreceu as fases iniciais do reparo ósseo periimplantar, com uma significativa contribuição na neoformação óssea em ratas submetidas à indução da osteoporose.

REFERÊNCIAS

1. BOSE, S. *et al.* Calcium phosphate coated 3D printed porous titanium with nanoscale surface modification for orthopedic and dental applications. **Mater Des.**, v. 151, p. 102-112, apr. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6690623/pdf/nihms-963565.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2022.

2. LERNER, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. **J Dent Res.**, v. 85, n. 7, p. 584-95, jul. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16798857/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

3. HURST, D. Evidence unclear on whether Type I or II diabetes increases the risk of implant failure. **Evid Based Dent.**, v. 15, n. 4, p. 102-3, dec. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25522938/>. Acesso em: 11 mar. 2022.

4. TOKER, H. *et al.* The Effects of Allograft Combined with Ozone Therapy on Regeneration of Calvarial Defects in Rats. **Cumhuriyet Dent J.**, v. 19, n. 2, p. 205-213, 2017. Disponível em: <http://cdj.cumhuriyet.edu.tr/tr/download/article-file/284792>. Acesso em: 11 mar. 2022.

5. GONENCI, R.; TABUR, M.; OZSOY, S. Y.; Preventive and Curative Effects of Medical Ozone in Rats Exposed to Experimental Osteomyelitis. **Pak Vet J.**, v. 37, n. 3, p. 355-359, 2017. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173278019>. Acesso em: 11 mar. 2022.

6. CATTEL, F. *et al.* Ozone therapy in COVID-19: a narrative review. **Virus Res.**, v. 291, jan. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7585733/>. Acesso em: 12 mar. 2022.

7. ROWEN, R. J. Ozônio e terapias de oxidação como solução para a crise emergente no manejo de doenças infecciosas: uma revisão do conhecimento e experiência atuais. **Med. Gás Res.**, v. 9, n. 4, p. 232-237, dez. 2017.

8. SOARES, C. D. *et al.* Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats. **Growth Factors.**, v. 37, n. 1-2, p. 95-103, apr. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31339390/>. Acesso em: 12 mar. 2022.

9. OZDEMIR, H. *et al.* Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. **J Periodontal Res.**, v. 48, n. 6, p. 722-6, mar. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23452156/>. Acesso em: 12 mar. 2022.

10. BUYUK, S. K.; RAMOGLU, S. I.; SONMEZ, M. F. The effect of different concentrations of topical ozone administration on bone formation in orthopedically expanded suture in rats. **Eur J Orthod.**, v. 38, n. 3, p. 281-5, jun. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4914903/>. Acesso em: 12 mar. 2022.

11. AGUILAR E. A. *et al.* Osteoporosis Diagnosis and Management in Long-Term Care Facility. **Am J Med Sci.**, v. 350, n. 5, p. 357-63, nov. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26517500/>. Acesso em: 15 mar. 2022.

12. LEHNERT, H. Underestimated osteoporosis: New directions in diagnosis and therapy. **DMW.**, v. 140, n. 22, p. 1660, 2015.

13. ZHOU, B. *et al.* Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **Lancet.**, v. 387, n. 10027, p. 1513-30, apr. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081106/>. Acesso em: 16 mar. 2022.

14. CHEN, J. et al. Gelatin microspheres containing calcitonin gene-related peptide or substance P repair bone defects in osteoporotic rabbits. **Biotechnol. Lett.**, v. 39, n. 3, p. 465-472, mar. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/311333741_Gelatin_microspheres_containing_calcitonin_gene-related_peptide_or_substance_P_repair_bone_defects_in_osteoporotic_rabbits. Acesso em: 17 mar. 2022.

15. CHEN, X. et al. Effect of Bone Mineral Density on Rotator Cuff Tear: An Osteoporotic Rabbit Model. **Plos One.**, v. 10, n. 10, p. 1-12, oct. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0139384&type=printable>. Acesso em: 16 mar. 2022.

16. LUVIZUTO, E. R. et al. 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.**, v. 55, n. 1, p. 52-59, jan. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996909002891>. Acesso em: 17 mar. 2022.

17. LUVIZUTO, E. R. et al. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. **Arch Oral Biol.**, v. 56, n. 10, p. 984-90, oct. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21536255/>. Acesso em: 18 mar. 2022.

18. RAMALHO-FERREIRA, G. et al. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. **Clin Oral Investig.**, v. 21, n. 5, p. 1485-1494, jun. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27460567/>. Acesso em: 18 mar. 2022.

19. EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 8, n. 3, p. 38-39, mar. 1922. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1084981/>. Acesso em: 19 mar. 2022.

20. LUVIZUTO, E. R. *et al.* Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. **Bone.**, v. 46, n. 4, p. 1021-9, apr. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20036346/>. Acesso em: 20 mar. 2022.

21. RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **J Biomed Opt.**, v. 20, n. 3, p. 1-7, mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25813805/>. Acesso em: 20 mar. 2022.

22. XIAO, W. *et al.*, Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Biosci Rep.**, v. 37, n. 6, dec. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5678031/>. Acesso em: 20 mar. 2022.

23. HE, J. *et al.* Assessment of implant cumulative survival rates in sites with different bone density and related prognostic factors: an 8-year retrospective study of 2,684 implants. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 30, n. 2, p. 360-71, 2015. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5369791>. Acesso em: 22 mar. 2022.

24. CHRCANOVIC, B. R.; ALBREKTSSON, T.; WENNENBERG, A. Diabetes and oral implant failure: a systematic review. **J Dent Res.**, v. 93, n. 9, p. 859-67, sep. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4541101/>. Acesso em: 22 mar. 2022.

25. ERDEMCİ, F. 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.**, v. 43, n. 6, p. 777-83, jun. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24491848/>. Acesso em: 22 mar. 2022.

26. MATSAMURA, K.; IKUMI, K.; NAKAJIMA, N. A trial of regeneration of periodontal ligament around implants dentários. **J Dent Res.**, v. 81, p. 101, 2002.

27. EL HADARY, A. A. et al. Evaluation of the effect of ozonated plant oils on the quality of osseointegration of dental implants under the influence of Cyclosporin A an in vivo study. **J Oral Implantol.**, v. 37, n. 2, p. 247–257, apr. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20545531/>. Acesso em: 25 mar. 2022.

28. KAZANCIOGLU, H. O.; ERİSEN, M. Comparison of low-level laser therapy versus ozone therapy in the treatment of oral lichen planus. **Ann Dermatol.**, v. 27, n. 5, p. 485–491, oct. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4622881/>. Acesso em: 25 mar. 2022.

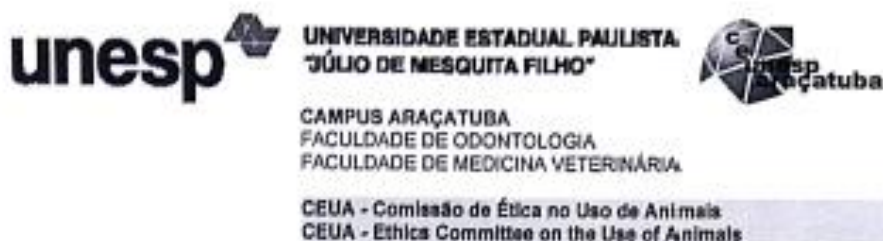
29. CHAGAS, N. T. C. et al. Wound treatment of Coendou prehensilis (Rodentia: Erethizontidae) with laser and ozone therapy: case report. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 71, n. 3, jun. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/GwKmwxxnxKrmj75XhNCSPXQb/?lang=pt>. Acesso em: 25 mar. 2022.

30. RICKARD, G. D. et al. Ozone therapy for the treatment of dental caries. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 2, n. 2, fev. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6366652/>. Acesso em: 25 mar. 2022.

31. LEMOS, C. S. *et al.* Prácticas integrativas y complementarias en salud para el tratamiento de las heridas crónicas: revisión integrativa de la literatura. **Aquichan.**, v. 18, n. 3, p. 327-342, sep. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/aqui/v18n3/1657-5997-aqui-18-03-00327.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2022.

ANEXO

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Osteogênese perimplantar em função da ozonioterapia na osteoporose induzida em ratas", Processo FOA nº 00431-2018, 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 14 Agosto de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 15 de Julho de 2020.

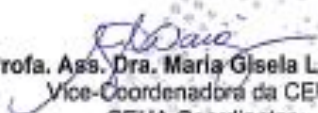
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 15 de Agosto de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Peri-implant osteogenesis as a function of ozon therapy in osteoporosis induced in rats", Protocol FOA nº 00431-2018, 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 August 14, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 15, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 15, 2020.


 Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
 Vice-Coordenadora da CEUA
 CEUA 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 E-mail CEUA: ceua@fba.unesp.br