JULIANA NOGUTI

**Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de
avaliação imunoistoquímica**

São Paulo

2010

JULIANA NOGUTI

**Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de
avaliação imunoistoquímica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São
Paulo, para obter o título de Mestre, pelo
programa de Pós-Graduação em
Odontologia

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa.Dra. Andrea Mantesso

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Noguti, Juliana

Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de avaliação imunoistoquímica / Juliana Noguti; orientadora Andrea Mantesso. -- São Paulo, 2010.

30p. : tab., Graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Reparo ósseo -- Ozônio diluído em água - Estudo. 2. Patologia bucal. I.Mantesso, Andrea. II. Título.

CDD 617.63
BLACK D64

Noguti J. Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de avaliação imunoistoquímica. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

À minha família: Maria Cândida, Yasuo Noguti, Tiago, Graça, Nicole, Sofia e Pedro Henrique, que sempre me apoiaram nas aventuras que regem minha vontade de aprender.

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Andrea Mantesso, pela atenção e acima de tudo pela paciência e preocupação que ela teve em momentos difíceis e que teve a sabedoria e a bondade de me ajudar e estender a mão para eu não desistir. Seus conhecimentos me levaram a outro nível de aprendizado, o que aprendi durante sua orientação, sem dúvida, levarei comigo pro resto da minha vida profissional.

À profa. Dra. Maria Cristina Z. Deboni, que participou desde o começo da minha vida acadêmica na FOU SP, que me acolheu nas suas idéias e que em momentos tumultuados esteve sempre positiva e torcendo para que eu chegasse até aqui.

Em nome da honra de ter sido aluna dessas professoras admiráveis e exemplo de pessoas e orientadoras, meu sincero Obrigada.

Ao aluno da pós-graduação da Odonto Legal Thiago Leite Beaini, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida e insistiu para que eu não desistisse. Seu carinho e amizade me fizeram criar uma admiração e respeito por tudo que ele representa hoje.

Às minhas amigas, Sara Apolinário, Monike Póvoas, Nicole Gomes Noguti, Aluana, Tais e Fátima que me escutaram muito, que me deram apoio, os ombros pra chorar e desabafar em momentos de angústia.

Aos meus amigos Ronald e Arthur, meus irmãos de mestrado que me ensinaram muito e por várias vezes esclareceram com atenção minhas dúvidas.

À Profa. Dra. Luciana Correa pela excelente recepção e auxílio fundamentais para a elaboração desta pesquisa.

Ao aluno da pós-graduação da Cirurgia e Bucomaxilo Facial Alexandre V.M Frascino, que se tornou um bom amigo e participou intensamente e com muito carinho de todo processo deste trabalho.

Ao colega de profissão Romano Mancusi, sem ele, não estaria aqui em São Paulo.

Ao Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial que possibilitou a realização da parte laboratorial deste trabalho.

À Elisa e Bia que me guiaram na resolução dos mistérios de cada experimento no laboratório de imunoistoquímica.

Noguti J. Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de avaliação imunoistoquímica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

RESUMO

A aplicação de ozônio pode ser usada como uma alternativa no tratamento de inúmeras patologias. O objetivo é interferir positivamente na reparação tecidual e na anti-sepsia de injúrias, uma vez que o ozônio é um potente agente antimicrobiano e possui a capacidade de estimular a circulação sanguínea e a resposta imunomodulatória. Tais características justificam o interesse da sua aplicação na Medicina e na Odontologia. Quando em contato com fluidos orgânicos, o ozônio age como um oxidante gerando a formação de moléculas reativas do oxigênio e produtos de lipídeos oxidantes que influenciam em eventos bioquímicos do metabolismo celular. A proposição deste estudo foi avaliar a aplicação do ozônio diluído em água no processo de reparação óssea através de análise morfológica e imunoistoquímica em modelo animal. Nossos resultados mostraram que a irrigação da ferida cirúrgica com ozônio diluído em água ocasionou atraso na reparação e que este era mais exuberante no início do processo.

Palavras-chave: Ozônio. Reparação óssea. Proteínas da matriz óssea.

Noguti J. Study of the effect of ozone dissolved in water in the bone repair by immunohistochemical evaluation [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

ABSTRACT

The ozone therapy can be used as an alternative for the treatment of numerous diseases. The goal is to positively affect tissue repair and antisepsis as ozone is a potent antimicrobial agent and has the ability to stimulate blood circulation and immunomodulatory response. These characteristics justify the interest of its application in Medicine and Dentistry. When in contact with body fluids, ozone acts as an oxidant generating reactive oxygen molecules and oxidative products of lipids influencing biochemical events of cellular metabolism. Therefore, the purpose of this study was to evaluate, in an animal model, the effect of ozone application during the bone wound healing process. These analyses were performed by the study of bone cells morphology and immunohistochemical expression of bone matrix proteins. Our results showed that the use of ozone diluted in water for irrigation caused a delay in early stages of bone repair. This delay was more prominent in the first phase of the bone wound healing.

Keywords: Ozone. Bone repair. Bone matrix proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Análise em HE.....	63
Figura 5.2 - Representação esquemática da reparação óssea dos grupos de 7 e 14 dias tratado e controle.....	65
Figura 5.3 - Imunoistoquímica das proteínas Col I, ONC, OPN e BSP de 7 dias com e sem ozônio	67
Figura 5.4 - Imunoistoquímica das proteínas Col I, ONC, OPN e BSP de 14 dias com e sem ozônio.....	69

LISTA DE TABELAS

4.1 - A titulação e o tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados e o eventual pré-tratamento realizados.....	51
4.2 - Análise histomorfológica da área central da ferida dos animais sacrificados 7 e 14 dias com e sem ozônio diluído em água MilliQ.®	57
4.3 - Análise Imunoistoquímica das proteínas do Col I, ONC, OPN e BSP dos animais sacrificados aos 7 dias com e sem ozônio diluído em água MilliQ.®	59
4.4 - Análise Imunoistoquímica das proteínas do Col I, ONC, OPN e BSP dos animais sacrificados aos 14 dias com e sem ozônio diluído em água MilliQ.®	59
4.5 - Comparações individuais segundo os marcadores dos grupos estudados pelo teste de Mann-Whitney.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Solução salina fosfato
BSP	Sialoproteína Óssea
BMP	Proteína Morfogenética
Cox-2	Ciclo oxigenase-2
Col I	Colágeno tipo I
CO	Monóxido de carbono
DAB	Diaminobenzadina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas do oxigênio
FADM	Forma atrofica de degeneração macular em função da idade
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina eosina
IL-1	Interleucina 1
NO	Óxido nítrico
NFkappa B	Fator nuclear kappa B
O	Átomo de oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido radical
-OH	Radical hidroxila
O ₃	Ozônio
O ₂	Oxigênio
ONC	Osteonectina

OPN	Osteopontina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PH	Potencial hidrogeniônico
POL	produtos oxidativos lipídeos
RANKL	Ativador receptor do ligante NFkappa β
Redox	Reações de oxidação e redução
TGF- α	Fator de crescimento tumoral α
TRIS	Tri-hidroxil-metil-aminometano
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro
µg	Microgramas
Kg	Kilograma
M	Metro
mL	mililitro
mg	Miligramas
ppm	Partes por milhão (=mg/L)
%	Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 REPARAÇÃO TECIDUAL E NEOFORMAÇÃO ÓSSEA	17
2.1.1 Estrutura do tecido ósseo	17
2.1.2 Formação do calo ósseo	18
2.2 AS PROTEÍNAS NÃO COLÁGENAS DO OSSO	21
2.2.1 Osteonectina.....	23
2.2.2 Osteopontina	24
2.2.3 Sialoproteína óssea.....	26
2.3 AS PROTEÍNAS COLÁGENAS DO OSSO	28
2.3.1 Colágeno tipo I	28
2.4 APLICAÇÃO DO OZÔNIO	29
2.4.1 Histórico	29
2.4.2 Bases científicas da aplicação do ozônio	31
2.4.3 Administração da aplicação do ozônio	32
2.4.4 Comportamento do ozônio	33
2.4.5 Mecanismos de ação do ozônio.....	37
2.4.6 Indicações da aplicação do ozônio.....	39
2.4.7 Aplicação do ozônio na Odontologia	43
3 PROPOSIÇÃO	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 AMOSTRA EXPERIMENTAL.....	47
4.2 PROCEDIMENTOS REALIZADOS	47
4.2.1 Procedimento cirúrgico	47
4.2.2 Produção de água ozonizada	49

4.2.3 Análise histomorfológica	49
4.2.4 Análise imunoistoquímica	50
4.2.5 Análise estatística	53
5 RESULTADOS	55
5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DA ÁREA FERIDA	55
5.1.1 Animais sacrificados após 7 dias	55
5.1.2 Animais sacrificados após 14 dias	55
5.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	58
5.2.1 Análise imunoistoquímica dos parâmetros utilizados	60
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
6 DISCUSSÃO	71
6.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	71
6.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	74
6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXO	95

1 INTRODUÇÃO

O ozônio é um componente químico que consiste de três átomos de oxigênio, organizados numa forma mais energética do que a molécula de oxigênio. É um dos mais importantes gases da estratosfera devido a sua capacidade de filtrar raios UV para manter o balanço biológico na biosfera (Nogales et al., 2008).

A aplicação do ozônio apresenta-se como alternativa terapêutica no tratamento de diversas doenças agudas e crônicas, visto que esse gás é capaz de intervir no equilíbrio de oxirredução. O ozônio é um potente oxidante e quando em contato com fluidos orgânicos gera a formação de moléculas reativas do oxigênio que irão influenciar os eventos bioquímicos do metabolismo celular, proporcionando efeitos antimicrobianos além de benefícios à reparação tecidual (Cruz et al., 1997)

Durante a primeira guerra mundial, o ozônio foi utilizado para tratar gangrenas pós-traumáticas, feridas infectadas e fístulas de soldados alemães (Bocci, 2004a). Sua aplicação foi aceita como alternativa de tratamento nos Estados Unidos de 1880 até 1932. Na época, a aplicação foi reconhecida como modalidade terapêutica em 16 países (Grootveld et al., 2004). Seu uso foi pesquisado no tratamento de patologias oculares (como neuropatias ópticas, glaucoma e doenças degenerativas da retina), infecções agudas e crônicas bacterianas, infecções virais e fúngicas, doenças isquêmicas, patologias ortopédicas e dermatológicas além de patologias pulmonares, renais e hematológicas. O ozônio pode reagir com componentes sanguíneos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e sistema vascular) bem como afetar positivamente o metabolismo de oxigênio, possui propriedades imunomediadas e influencia o sistema de defesa antioxidante e a microcirculação (Baysan; Lynch, 2004; Bocci, 2004a).

As propriedades microbiológicas e metabólicas do ozônio promovem uma atividade desinfetante, tanto na fase gasosa como na fase aquosa (Nagayoshi et al., 2004) e age contra bactérias, fungos, protozoários e vírus (Kim et al., 2009; Arita et al., 2005). Acredita-se que o potencial oxidante do ozônio induz a destruição da parede celular e da membrana citoplasmática de bactérias e fungos. Durante este processo, o ozônio interage com glicoproteínas, glicolipídeos e outros aminoácidos

além de bloquear o sistema de controle enzimático da célula (Arita et al., 2005). Isto resulta em aumento da permeabilidade da membrana que é o elemento chave da viabilidade celular, o que ocasiona imediata suspensão funcional do microorganismo (Nagayoshi et al., 2004; Holmes, 2003; Arita et al., 2005). O ozônio também pode atacar muitas biomoléculas, como cisteína, metionina e resíduos protéicos de histidina (Holmes, 2003).

A capacidade do ozônio em interferir nas reações bioquímicas celulares está relacionada aos eventos observados na reparação tecidual e podem ser interpretados como favoráveis dependendo da situação clínica (Bocci et al., 2009). Diante disso, o futuro da aplicação do ozônio está baseado em pesquisas que possam estabelecer parâmetros seguros e confiáveis para sua utilização e que demonstrem sua efetividade quanto ao seu potencial para tratamentos traumáticos, assépticos e antimicrobianos (Nogales et al., 2008).

As proteínas presentes no osso possuem muitas funções como mineralização de fibras colágenas, modulação de divisão, migração, diferenciação e maturação de células ósseas (Robey; Boskey, 1996). As proteínas não colágenas como a osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina e as proteínas colágenas como colágeno tipo I desempenham importante papel na organização da matriz colágena e na regulação do crescimento dos cristais de hidroxiapatita (Ganss et al., 1999). Essas proteínas são muito estudadas no intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos no processo de mineralização e a participação dessas proteínas no processo de reparação óssea. Elas são produzidas em diferentes estágios da osteogênese e são responsáveis pela diferenciação osteoblástica, regulação dos processos de mineralização e reabsorção óssea (Aubin et al., 1996; Nefussi et al., 1997). Atualmente não existe na literatura estudo relacionando o uso do ozônio à reparação óssea e assim, este é o tema do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REPARAÇÃO TECIDUAL DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

2.1.1 Estrutura do tecido ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada, heterogênea de tecido conjuntivo que é constituído por células da matriz extracelular (MEC). A característica que o distingue é a mineralização da matriz, que produz um tecido extremamente duro, capaz de desempenhar importantes funções, tais como: sustentação, proteção, hematopoiese e homeostase do cálcio e fósforo (Rumi et al., 2005). Os constituintes celulares são: (1) células osteoprogenitoras, que são de origem mesenquimal e possuem propriedades de células tronco, ou seja, com potencial para proliferação, diferenciação e auto renovação e estão presentes na camada interna do perióstio e do endóstio. Essas células originam os osteoblastos por um mecanismo regulador que envolve fatores de crescimento e transcrição (Klein et al., 2003). As células progenitoras permanecem ao longo da vida pós-natal como células de revestimento ósseo que são ativadas na vida adulta durante o reparo de fraturas ou outras lesões (Klein et al., 2003).

Além das células osteoprogenitoras, estão presentes os (2) osteoblastos, células diferenciadas com formato cúbico ou cilíndrico e de aparência epitelial que forma uma monocamada que recobre todos os locais ativos de formação óssea. Essas células são polarizadas, depositam osteóide (matriz não-orgânica do tecido ósseo) e estão associadas à calcificação da matriz. Em eletromicrografias, os osteoblastos exibem características típicas de células ativamente engajadas na síntese, glicolização e secreção de proteínas. Seus produtos específicos são colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea; além disso, os osteoblastos produzem fatores de crescimento, em particular, os membros da família de proteínas morfogenéticas; (3) osteócitos, são os osteoblastos aprisionados em lacunas mineralizadas que eles próprios produziram e possuem papel fundamental

no desenvolvimento do esqueleto. Sua diferenciação envolve a participação de dois fatores de transcrição; o Cbfa/Runx2 e o osterix, (4) osteoclastos, que não pertencem à linhagem de células progenitoras, ao contrário, são derivados dos monócitos localizados na medula óssea que atingem o tecido ósseo através da circulação sanguínea e se fundem em células multinucleadas, gerando um ambiente ácido isolado necessário para a reabsorção óssea (Klein et al., 2003)

Além dos componentes celulares, a estrutura óssea é ainda envolvida por duas camadas, o periósteo e o endósteo. O periósteo é formado por uma camada interna de osteoblastos e por uma camada externa rica em vasos sanguíneos, alguns dos quais penetram nos canais de Volkmann e em espessas fibras colágenas de ancoragem chamadas fibras de Sharpey. O endósteo é formado por células pavimentosas e fibras de tecido conjuntivo que revestem as paredes do tecido ósseo esponjoso, abrigando a medula óssea e se estendendo para todas as cavidades do tecido ósseo (Klein et al., 2003; Schindeler et al., 2008).

A matriz óssea é formada por componentes orgânicos e inorgânicos, contém fibras de colágeno do tipo I (90%), proteoglicanas e proteínas não colagênicas. As proteínas não colagênicas da matriz incluem também a osteocalcina (OCC), osteopontina (OPN) e osteonectina (ONC), sintetizadas por osteoblastos e com propriedades específicas na mineralização do tecido ósseo (Klein et al., 2003).

2.1.2 Formação do calo ósseo

A formação do calo ósseo após injúria envolve uma variedade de eventos celulares e moleculares, porém os mecanismos atrás desses processos ainda não estão completamente elucidados. Análises clínicas e experimentais sugerem uma variedade relativa de eventos que acontecem nesse processo (Klein et al., 2003). O mecanismo de padrão de reparação é considerado uma recapitulação da osteogênese que ocorre no embrião e durante o período de crescimento (Buser, 1994), envolvendo certos aspectos entre células, fatores de crescimento e matriz extracelular (Schindeler et al., 2008).

Após a fratura inicia-se o processo de proliferação celular intenso que interessa às células do periósteo, às células do endósteo e às da medula óssea. Esta proliferação ocorre também nos tecidos periféricos onde a multiplicação das células multipotentes permitem a invasão do calo ósseo por novos vasos peri-ósseos que são responsáveis pela restauração da continuidade da circulação sanguínea entre os fragmentos e pela vascularização do calo ósseo. A irrigação sanguínea após uma fratura passa a se processar por via centrípeta, devido à redução da pressão intra-medular. A irrigação perióstica passa a ser mais importante e esta é apoiada por um suprimento extra-ósseo vindo da musculatura circundante. O calo se forma, servindo de ponte entre dois topos da lesão, é inicialmente vascularizado pelo sistema extra-ósseo e só mais tarde o sistema medular é restaurado (Dudley; Jonhson, 1997).

A reparação óssea é tipicamente caracterizada por 4 estágios: resposta inicial inflamatória, formação do calo cartilaginoso, formação do calo ósseo, união inicial do osso e remodelação óssea, contudo, na prática estes estágios se confundem (Schindeler et al., 2008).

O primeiro estágio é a inflamação, uma fratura é associada com o rompimento da integridade do tecido mole, interrupção da função vascular normal associada à distorção da arquitetura óssea. Esta injúria leva à ativação não específica de vias de reparação. O extravasamento de sangue dentro do sítio da fratura é contido pelo tecido ao redor da lesão, levando à formação do hematoma. Plaquetas, macrófagos e outras células inflamatórias (granulócitos, linfócitos e monócitos) infiltram pelo hematoma entre fragmentos ósseos fraturados e o combate à infecção ocorre pela secreção de citocinas e fatores de crescimento levando à formação do trombo fibroso (Einhorn, 1998; Gerstenfeld et al., 2003). Com o passar do tempo e da reparação, os capilares sanguíneos se proliferam na lesão, os quais são reorganizados dentro do tecido de granulação, enquanto macrófagos, células gigantes e outras células fagocitárias degeneram e fagocitam células mortas além de outros debris (Schindeler et al., 2008).

O segundo estágio consiste na formação do calo fibrocartilaginoso, muitas das lesões possuem algum grau de instabilidade mecânica e a neoformação óssea ocorre por meio da ossificação endocondral (Gerstenfeld et al., 2003). Neste estágio há a predominância de células como condrócitos e fibroblastos, embora essa

quantidade possa variar dependendo da fratura e da localização da lesão. Estas células produzem um calo semi-rígido que promove suporte mecânico à lesão, agindo também como molde para o calo ósseo que se formará (Schindeler et al., 2008). No estágio final da produção do calo cartilaginoso, os condrócitos sofrem hipertrofia e mineralizam a matriz cartilaginosa antes de sofrerem apoptose (Barnes et al., 1999).

A formação do calo ósseo acontece em seguida, este estágio representa o período mais ativo da osteogênese. É caracterizado por altos níveis de atividade osteoblástica e de formação do matriz óssea mineralizada, o qual resulta diretamente no calo periférico nas áreas de estabilidade. Gradualmente o calo cartilaginoso vai sendo substituído pelo calo ósseo, irregular e sob remodelação, concomitantemente com a revascularização (Klein et al., 2003; Schindeler et al., 2008).

A fonte de células osteoprogenitoras responsáveis pela remodelação e neoformação óssea permanece ambígua. O perióstio é uma fonte rica em células-tronco hábeis em se diferenciar e produzirem osso e que a recuperação da lesão é muitas vezes retardada quando o perióstio é danificado ou retirado (Hutmacher; Sittinger, 2003; Malizos; Papatheodore, 2005). A medula óssea também contém células-tronco mesenquimais capazes de contribuir para a neoformação óssea durante a reparação (Baksh et al., 2004; Colnot et al., 2006). Entretanto, mesmo na ausência do perióstio e de células osteoprogenitoras há a formação do calo ósseo, sendo possível que células osteoprogenitoras possam, portanto, originarem-se de múltiplas fontes incluindo a circulação, a vascularização e os tecidos ao redor da injúria (Rumi et al., 2005).

O estágio final da reparação óssea abrange a remodelação do osso em configuração próxima ao osso cortical original e/ou trabecular. Esta fase também é denominada como formação óssea secundária (Gerstenfeld et al., 2003). Inicialmente, isto envolve a conversão do osso irregular do calo em osso lamelar ou maduro, até que a estrutura padrão do osso seja restaurada. O processo de remodelação é coordenado por alguns processos que acompanham produção e reabsorção óssea; a célula chave para isso é o osteoclasto. Para uma remodelação efetiva, os osteoclastos tornam-se polarizados e aderem à superfície mineralizada e

promovem ambiente ácido fazendo com que proteinases degradem componentes orgânicos como o colágeno (Schindeler et al., 2008).

Embora a sequência dos quatro estágios da reparação óssea seja descrita separadamente, os eventos ocorrem simultaneamente. Assim, existe uma sobreposição dos estágios como, por exemplo, a substituição do calo cartilaginoso em calo ósseo lamelar ou secundário, não sendo, portanto, eventos distintos. Contudo, eventos fundamentais como proliferação celular, diferenciação e síntese de matriz à nível celular é restrita somente ao primeiro estágio da reparação (Gerstenfeld et al., 2003).

Todas as fases da reparação são coordenadas por citocinas e fatores de crescimento específicos (Cotran et al., 1994). Duas importantes citocinas que são secretadas por osteoblastos e são essenciais para indução, sobrevivência e competência dos osteoblastos são: M-CSF e Ativador-receptor do ligante NFkappa β (RANKL). M-CSF é importante para a indução primária na diferenciação das células-tronco hematopoiéticas em linhagem osteoclástica (Fan et al., 1997). RANKL é um fator produzido por osteoblastos maduros que são responsáveis pela coordenação da formação e reabsorção óssea (Kong et al., 1999). Além desses fatores, a quantidade de fatores de crescimento e de citocinas presentes da reparação são conhecidas na promoção da osteoclastogênese. Estas incluem interleucinas, TNF- α , BMPs e TGF- β (Quinn; Gisleespie, 2005).

2.2 AS PROTEÍNAS NÃO COLÁGENAS DO OSSO

As proteínas não colágenas correspondem aproximadamente 10% da matriz orgânica do osso, possuem importantes funções na regulação da mineralização e são responsáveis por unir os cristais de hidroxapatita em suas diferentes fases (Sommer; al, 1996; Ogata, 2008).

Atualmente foram identificadas cerca de 17 proteínas não colágenas em osso. As funções exatas dessas proteínas não foram totalmente esclarecidas, porém algumas exercem múltiplas funções como a regulação da mineralização das fibras

colágenas, modulação da divisão, migração, diferenciação e maturação das células ósseas (Robey; Boskey, 1996).

Essas proteínas estão relacionadas na organização da matriz colágena e na regulação da formação e do crescimento de cristais de hidroxiapatita (Ganss et al., 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que a maior parte das proteínas não colágenas atua como nucleador ou inibidor do crescimento desses cristais de forma dependente da sua concentração (Robey; Boskey, 1996; Boskey, 1998).

A formação do osso pelos osteoblastos requer a deposição de matriz extracelular que consiste de colágeno tipo I (Col I) e uma variedade de proteínas não colágenas, que subsequente mineralizam o tecido pela formação de cristais de hidroxiapatita. Fibras de colágeno tipo I são o mais abundante constituinte orgânico e podem estar envolvidos no alinhamento dos cristais minerais (Ogata, 2008).

A fase orgânica dos tecidos mineralizados consiste principalmente de colágeno e proteínas da matriz não colágenas. Osso, dentina e colágeno contêm colágeno tipo I, cartilagem contêm colágeno tipo II, enquanto que o esmalte é virtualmente livre dessa proteína (Robey; Boskey, 1996).

As proteínas da matriz não colágenas definem as propriedades específicas de vários tecidos mineralizados. Tais proteínas expressam-se de maneira fortemente controlada. Sua sequência de expressão depende da localização e do estágio de diferenciação na produção celular (Fincham, 1982). A maioria das células que sintetizam os componentes da matriz extracelular de tecidos mineralizados são de origem mesenquimal. Estas incluem osteoblastos e condrócitos que formam o osso e a cartilagem, respectivamente, odontoblastos e cementoblastos do órgão do esmalte, que formam a dentina e o cimento. Apenas os ameloblastos que são responsáveis por produzirem o esmalte do dente são de origem epitelial (Sommer; al, 1996).

As principais proteínas não colágenas da matriz extracelular são a osteonectina (ONC), osteopontina (OPN), a sialoproteína óssea (BSP) e a osteocalcina (OCC) (Sommer; al, 1996). Elas são sintetizadas em diferentes estágios da osteogênese e são responsáveis pela diferenciação osteoblástica, regulação dos processos de mineralização e de reabsorção óssea (Nefussi et al., 1997).

2.2.1 Osteonectina

A osteonectina (ONC), também conhecida como SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cystein) ou BM-40 (Basement Membrane 40), é a proteína não colágena mais abundante da matriz extracelular óssea, representando cerca de 25% das proteínas não colágenas (Park et al., 1996).

É considerado o nucleador da mineralização, atuando também como inibidor do crescimento dos cristais de hidroxiapatita. Está associada com a formação da matriz óssea uma vez que é expressa antes da deposição dos cristais de hidroxiapatita, juntamente com a osteopontina (OPN) (Sommer et al., 1996; Boskey, 1998).

Acredita-se que a ONC regula a proliferação celular, estimula a angiogênese e a produção de metaloproteinases. Pesquisas experimentais em camundongos, a deficiência de osteonectina levou à diminuição da remodelação óssea, levando à osteopenia quando em idade senil (Park et al., 1996). Esse *turnover* ósseo diminuído é associado como resultado de ambas as reduções de osteoclastos e osteoblastos com consequente diminuição do desenvolvimento da massa óssea (Gundberg, 2003).

Embora ONC possa ser encontrada em outros tecidos conjuntivos durante certos estágios de maturação de desenvolvimento, apenas um número limitado de tipos celulares sintetiza ONC constitutivamente, sendo acumulada somente no osso, cartilagem hipertrófica e alfa-grânulos de plaquetas (Stenner et al., 1986).

Assim, a ONC é encontrada em osteoblastos, osteócitos, condrócitos hipertróficos, odontoblastos e cementoblastos bem como na matriz osteóide, osso, dentina e cimento (Sommer; al, 1996; Nefussi et al., 1997). Embora apareça em maior concentração no osso, não é uma proteína específica deste tecido, podendo ser encontrada em outros locais como plaquetas, células endoteliais, fibroblastos do ligamento periodontal, macrófagos, membrana basal de neoplasias, glândula adrenal, gônadas, rim, brônquios, pele, megacariócitos, intestino, medula óssea, tendão, mesentério, artéria, cristalino, fígado e córnea. Na avaliação de Sommer et al (1996), no desenvolvimento do metatarso de ratos, a ONC foi detectada após 16

dias do período embrionário com forte marcação nos osteoblastos, controlando dessa maneira, a proliferação da linhagem osteoblástica (Sommer; al, 1996).

2.2.2 Osteopontina

A osteopontina (OPN) é um membro da família das ligantes de integrinas com N-linked glicosilação (SIBLING). É uma proteína ácida que contém cerca de 300 aminoácidos, é altamente fosforilada e glicosilada, possui um domínio ligante de cadeia arginina-glicina-ácido aspártico bem como dois sítios de ligação heparina (Weber, 2001). A OPN possui atividade em uma variedade de tecidos, incluindo osso, rins além do sistema imune e vascular. No osso, esta proteína atua dentro da matriz extracelular para promover a união do osteoclasto às superfícies mineralizadas, além de atuar como fator solúvel para ativar vias de sinalização intracelular (Denhardt et al., 2001). A OPN influencia a homeostase do osso, tanto inibindo a deposição de minerais como promovendo a diferenciação dos osteoclastos e sua atividade (Standal et al., 2004; Monfoulet et al., 2009).

Os osteoclastos desenvolvem-se de precursores de células da família dos macrófagos/monócitos para se tornarem células gigantes multinucleadas capazes de reabsorver o osso. A maturação dos macrófagos em osteoclastos depende basicamente de dois fatores secretados ou expressos pelas células estromais/osteoblastos: o fator de estímulo de colônia de macrófagos e do receptor para ativação da via NFkappa β (Teitelbaum, 2000). A OPN não é essencial no desenvolvimento dos osteoclastos durante o desenvolvimento ósseo (Rittling et al., 1998). Entretanto, várias pesquisas mostram que em situações patológicas, a OPN é importante na osteoclastogênese (Standal et al., 2004).

Em tecidos mineralizados a OPN é produzida por osteoclastos e osteoblastos. Ela é altamente concentrada em sítios onde há osso neoformado e superfícies ósseas que interagem com células (Teitelbaum, 2000; Standal et al., 2004).

A expressão da OPN é elevada em resposta às citocinas pró-inflamatórias e à fadiga mecânica do osso (Denhardt et al., 2001). Devido à expressão da OPN ser induzida por várias citocinas inflamatórias e ser produzida por macrófagos em

resposta a um estímulo inflamatório, acredita-se que a OPN possa estar envolvida na osteólise (Asou et al., 2001).

Animais experimentais deficientes em OPN exibiram reparação óssea deficiente, caracterizada por normalidade da união da ferida com debridamento anormal dos macrófagos e maturação anormal de colágeno (Liaw, 1998). Estes animais também exibiam menos infiltração de macrófagos e deposição de colágeno nos rins com fibrose intersticial renal. A progressiva hipertrofia das artérias pulmonares foi revertida pela inibição da atividade de metaloproteinases. A apoptose de células de músculo liso que resulta na inibição da atividade da matriz de metaloproteinase foi suprimida pela OPN, sugerindo que a OPN suprime a fibrose seguida da inflamação, talvez pelo fato de que ela possua a habilidade em apoiar a sobrevivência da célula (Sodek et al., 2000).

Além disso, como em tecidos mineralizados, a presença de OPN pode ser um regulador único da calcificação distrófica, consequência deletéria da reparação e da inflamação. Lesões no revestimento endotelial dos vasos pode ser a causa da calcificação. Durante a inflamação, como resultado de tal injúria, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios liberados pelas plaquetas induzem a invasão de leucócitos e a proliferação de células do local. Várias citocinas, dentre elas a OPN, são reguladas pelas células do músculo liso e macrófagos (O'Regan A ; Berman, 2000). Embora a integridade do tecido seja geralmente restaurada, ocasionalmente o processo torna-se patológico, o que resulta em excessiva proliferação celular. Se existe alguma contribuição que a OPN possua neste processo, permanece ainda a ser estabelecida, mas desde que a OPN possa funcionar como um regulador negativo da calcificação, é possível que a calcificação em patologias como aterosclerose seja baseada na sua ausência (Sommer; al, 1996; Sodek et al., 2000).

Embora não seja solicitada na formação e no desenvolvimento normal do osso, a presença de OPN na superfície do osso é essencial para a remodelação do osso maduro. A abundância e distribuição de aspartato e resíduos de serina fosforilada em OPN causam uma forte ligação nos cristais de fosfato de cálcio em tecidos mineralizados, inibindo o crescimento do cristal (Jono et al., 2000; Sodek et al., 2000).

Certas funções da OPN requerem fosforilação, um fato interessante, já que a fosforilação da OPN pode ser controlada pelas fosfatases extracelulares e proteínas quinases. As fosfatases extracelulares induzem a expressão nos osteoblastos-*like* MC3T2 (Beck et al., 2000). Esta regulação pode ser um mecanismo de controle que leva ao aumento na expressão da OPN para interromper a proliferação osteoblástica e o início da diferenciação, eventos que coincidem com a indução da alcalina fosfatase. A indução pelo fosfato também contribui para elevar os níveis da expressão de OPN nos osteoclastos envolvidos na reabsorção da matriz óssea e na solubilidade dos minerais do osso (Denhardt et al., 2001).

A OPN é quimiotática para vários tipos celulares, notavelmente monócitos/macrófagos que são atraídos para sítios de infecção e inflamação. É essencial para mediar a atuação do sistema imunológico e formar a Th1, uma citocina que atua durante a formação do granuloma. A OPN serve para unir células ósseas a matriz e gerar sinais intracelulares fundamentais para a mobilidade do osteoclasto no osso, além de mediar o reconhecimento do osteócito no osso (Denhardt et al., 2001; Sodek et al., 2000).

2.2.3 Sialoproteína óssea

A sialoproteína óssea (BSP) é uma proteína unicamente encontrada em tecidos mineralizados. É expressa em altos níveis da neoformação óssea (Chen et al., 1991) e cimento (MacNeil et al., 1995). Conseqüentemente, um considerável interesse é gerado em torno da BSP, como nucleador potencial da hidroxiapatita e marcador específico de osteoblastos em diferenciação e de cementoblastos. Entretanto, a ligação de células e as propriedades de sinalização da BSP indicam múltiplas funções para esta proteína na remodelação óssea e também em várias patologias (Ganss et al., 1999).

A BSP constitui de 8 a 12% do total de proteínas colágenas no osso e no cimento, com quantidades pequenas encontradas na dentina (-1%) (Fisher et al., 1983). Recentes pesquisas mostraram que a BSP também é expressa pelos ameloblastos (Chen et al., 1998). No entanto, os níveis de expressão em cartilagem

mineralizada, dentina e esmalte são menores do que em osso neoformado e cimento (Chen et al., 1991).

Métodos de hibridização *in situ* em calvária e tibia de camundongo revelaram que a indução do gene da BSP coincide com a formação inicial da matriz mineralizada tanto na ossificação intramembranosa como na endocondral e seus maiores níveis encontram-se durante a formação embriogênica do osso (Chen et al., 1991). O mRNA da BSP é altamente expresso em células osteoblásticas cuboidais que estão ativamente formando matriz óssea na superfície ectocranial no 21º dia da embriogênese do crânio do camundongo. Em contraste, o revestimento celular da superfície endocranial da calvária do feto do animal, mostrou somente uma leve expressão da BSP (Chen et al., 1992). Em ossos longos, a expressão mais acentuada está localizada na espongiose primária e tardia 14 dias pós-natal no centro secundário de ossificação da cartilagem articular (Shapiro et al., 1993). Enquanto que o mRNA da BSP não está claramente demonstrado em pré-osteoblastos, é detectável em osteoblastos de osso na embriogênese (Bianco et al., 1991) e nos osteócitos indicando que o gene da BSP é induzido quando osteoblastos são formados (Shapiro et al., 1993).

Similarmente, a análise compreensiva da formação do cimento mostrou que o gene da BSP é ativado com a diferenciação dos cementoblastos e que altos níveis da sua expressão estão associados com a rápida e recente formação da matriz do cimento mineralizada (MacNeil et al., 1996).

Análises imunoistoquímicas mostraram que a BSP está presente por completo em lamelas e nas porções do osso cortical e trabecular além de estar presente nas linhas do cimento e do tecido osteóide (Roach, 1994). A BSP também é localizada especificamente em tecidos mineralizados do periodonto intacto e na reparação de animais de laboratório, mandíbula em desenvolvimento e no tecido osteóide do osso formando sobre a cartilagem nas epífises de ossos longos (Shen et al., 1995).

Ogata (2008) relata que a BSP também é expressa nas mamas, pulmões, tireóide e em câncer de próstata, possui uma capacidade angiogênica, além de ser importante na diferenciação osteoblástica, na mineralização da matriz óssea e na metástase tumoral. Nos processos neoplásicos, a BSP está relacionada com a

mineralização focal presente com maior chance de metástases e prognóstico ruim, levando muitas vezes a metástase no osso.

A BSP expressa pelas células neoplásicas circulantes pode favorecer as interações com a matriz óssea mediando união dessas células aos cristais de hidroxiapatita (Waltregny et al., 1998).

2.3 AS PROTEÍNAS COLÁGENAS

2.3.1 Colágeno tipo I

A matriz extracelular (MEC) é uma complexa estrutura composta por colágenos, glicoproteínas e proteoglicanas que regula inúmeros processos fundamentais celulares como migração, proliferação e diferenciação. A MEC fornece combinação complicada de fatores insolúveis que quando associados a fatores de crescimento solúveis e contato célula-célula modula a expressão gênica e conseqüentemente funções celulares (Hagios et al., 1998; Lukashev; Werb, 1998).

O efeito regulador da MEC depende não somente de sua composição mas também de sua estrutura. Proteínas de colágeno tipo I (Col I) *in vivo* estão organizadas dentro das fibras. Estas estruturas são responsáveis pela resistência de muitos tecidos que são perdidos pela degradação proteolítica do colágeno. As mudanças na natureza física do colágeno podem surtir efeito no comportamento celular. *In vitro*, células endoteliais embebidas de Col I espontaneamente formaram estruturas tubulares (Madri; Williams, 1983). Quando se substituiu Col I por outra proteína da matriz extracelular como laminina ou colágeno tipo IV, não houve formação tubular (Grant; Kleinman, 1997).

Os colágenos são formados de 19 cadeias α diferentes (cadeia α : denominação dada a cada cadeia polipeptídica que forma a tripla hélice do colágeno) e que por associação 3 a 3, dão origem a pelo menos 27 tipos de proteínas. Estes são classificados em três grandes grupos, em função das características da organização macromolecular da tripla hélice (Silva, 2005).

De fato, a conformação do colágeno na indução do comportamento de células endoteliais é essencial. Col I, desnaturado onde há falta do domínio tripla hélice da sua estrutura, não induz células endoteliais a formarem a disposição de tubos (Sweeney et al., 1998)

O componente primário da matriz óssea, como em todos os tecidos conjuntivos, é o colágeno. Foi reportado que a própria matriz óssea mineralizada contém apenas Col I. Foi constatado que quantidades de colágeno tipo III, tipo V e colágeno FACIT (colágeno associado à fibra com três hélices interrompidas podem ser detectadas em pequenas quantidades. É possível que esses colágenos tenham origem na vasculatura que invade o osso que é muito difícil de ser removida antes de extração química ao invés da própria matriz óssea. É provável que estes tipos de colágenos regulem o diâmetro das fibras de colágeno tipo I (Nanci, 1999) (Robey; Boskey, 1996).

No tecido ósseo e na dentina, o Col I dá início ou inibe por completo a deposição de hidroxiapatita, através de mecanismo complexo que envolve proteínas ácidas presentes na matriz extracelular (Calvert, 1994). Embora o Col I esteja distribuído em todo o organismo, sua mineralização, além do tecido ósseo e dos dentes, só ocorre em outros tecidos em condições patológicas como em calcificação de válvulas cardíacas (Gundberg, 2003).

2.4 APLICAÇÃO DO OZÔNIO

2.4.1 Histórico

Christian Friedrich Schönbein em 1839 relatou a existência de um gás com odor característico e que, de acordo com o idioma grego, ele traduziu essa percepção sensitiva para a palavra “ozônio”. Assim, o ozônio foi apresentado à comunidade científica na palestra da Sociedade de Ciência Natural de Basel - Suíça intitulada: “No odor do eletrodo positivo durante a eletrólise da água” (Burns, 1997; Ruben, 2001). O ozônio “in natura” é continuamente produzido na estratosfera (a 25 – 30 km

da superfície terrestre) pela radiação UV ($< 183 \text{ nm}$) e formado pela divisão de moléculas de oxigênio atmosférico dentro de dois átomos altamente reativos. De acordo com a teoria de Chapman, através de uma reação endotérmica, cada um desses átomos combina-se como oxigênio intacto para formar o ozônio triatômico (Bocci et al., 2009).

O primeiro gerador de ozônio foi desenvolvido por Werner Von Siemens, na Alemanha, por volta de 1854. No entanto, o primeiro relato do seu uso terapêutico foi feito por Lender, em 1870, com o propósito de purificar o sangue (Society., 2001).

Durante a I guerra mundial, o ozônio foi utilizado para tratar soldados alemães portadores de feridas infectadas, fístulas e gangrenas pós traumáticas causadas pela bactéria anaeróbica *Clostridium*. Num estudo pioneiro, Stocker reportou os primeiros 21 casos tratados com ozônio com sucesso no Hospital Militar Rainha Alexandria (Fish, 1936). A aplicação do ozônio foi aceita como alternativa na medicina nos Estados Unidos de 1880 até 1932. Até esta data, havia sido reconhecida como modalidade de tratamento em 16 países (Grootveld et al., 2004).

Na odontologia, a aplicação do ozônio iniciou-se de maneira incerta, com a participação do Dr. E.A Fisch (1899-1966). Ele teve a idéia de utilizar o este gás em seus tratamentos e é considerado o primeiro dentista a utilizar água ozonizada. Além disso, apresentou a sua forma terapêutica ao cirurgião alemão Dr. Erwin Payr (1871-1946) que utilizou em sua prática médica e divulgou seus resultados no 59º Congresso da Sociedade Cirúrgica Alemã em Berlin - Alemanha, o ano era 1935 (Bocci, 2005) com o trabalho intitulado: “ Que outro desinfetante seria melhor tolerado que o Ozônio?. Os resultados positivos em 75% dos pacientes, a simplicidade, as condições higiênicas e a segurança do método foram algumas das vantagens descritas pelo médico (Kühnel; Seifert, 1998; Bocci, 2005).

Em 1936, o físico francês, Dr. P. Auborg tratou sucessivamente colite crônica e fístula do reto pela insuflação direta de mistura de oxigênio-ozônio via retal. Dr. Payr foi o primeiro médico a injetar um pequeno volume de gás $\text{O}_2 - \text{O}_3$ diretamente na veia cubital humana, dando origem ao procedimento que nos anos 90, adotado erroneamente, tornou-se perigoso e foi prontamente proibido, prejudicando, dessa maneira, pesquisas e investimentos a respeito do uso do ozônio (Bocci, 2002). Outra técnica para a utilização do ozônio foi criada pelo físico Hans Wolf (1927-1980) que desenvolveu a autohemoterapia ozonizada (O_3 -AHT) insuflando *ex vivo* o

gás dentro do sangue contido num frasco de vidro resistente, estéril e descartável (Bocci, 2008).

Assim, por quase três décadas a aplicação do ozônio foi utilizada na Alemanha, contudo, alguns estudos clínicos geraram ceticismo e trouxeram prejuízos que perduram até hoje sob a afirmação de que o “Ozônio é tóxico, não importa como você trabalhe, não é aconselhável seu uso na medicina” (Bocci, 2004b). Nesse sentido, é válido mencionar que Timbrell (2005) escreveu em seu livro: “Os fatos essenciais para o uso do ozônio são: primeiro, é a dose que faz a toxicidade de uma substância e segundo e mais importante, a toxicidade resulta na interação entre defesas químicas e biológicas”. De fato, a sutileza e a complexidade dos sistemas biológicos podem mudar o conceito de que o ozônio é sempre tóxico (Timbrell, 2005; Bocci et al., 2009).

2.4.2 Bases físicas da aplicação do ozônio

O ozônio apresenta-se como um gás feito de três átomos de oxigênio com uma estrutura cíclica. Dependendo de uma série de condições, como temperatura e pressão, o O_3 pode se decompor rapidamente em moléculas de átomos puros de oxigênio, liberando potentes oxidantes (Stübinger et al., 2006).

O gerador de ozônio produz em sua forma pura o oxigênio que passa através de gradiente de alta voltagem (5-13mV) de acordo com a reação:

Conseqüentemente, coleta-se uma mistura de gás compreendendo não menos que 95% de oxigênio e não menos do que 5% de ozônio. O ar deve ser excluído devido ao dióxido de nitrogênio que é tóxico (N_2O_2), por isso é imperativo que geradores devam ser feitos com alta qualidade, com materiais resistentes ao ozônio como aço inoxidável, vidro ou Teflon®.

Em temperatura ambiente, o ozônio é um gás azul de odor característico que pode ser notado em concentrações acima de 2 ppm (Bocci, 2006; Stübinger et al., 2006).

Em condições normais, a concentração do ozônio no ar atmosférico gira em torno de 0,1 ppm e em condições de muita poluição pode exceder 0,8 ppm (Valacchi; Bocci, 2000; Valacchi et al., 2002; Valacchi et al., 2005).

O ozônio é 1.6 vezes mais denso e 10 vezes mais solúvel na água (49,0 mL em 100mL de água a 0°C) do que o oxigênio. Embora o ozônio não seja um radical, é o terceiro mais potente oxidante ($E^\circ = + 2.076 \text{ V}$) depois do fluoreto e persulfato. Assim, o ozônio é um gás instável que deve ser utilizado de uma só vez em função da sua meia vida de cerca de 40 minutos a 20°C (Boc ci, 2006).

Após a formação do ozônio, este reage com qualquer doador de elétron que sofre oxidação, gerando o O_2^- (superóxido ânion radical), que se decompõe em radical hidroxila, formando também molécula de dioxigênio. Dessa forma, esta reação torna o ozônio um oxidante potente que pode agir como precursor de uma série de outros radicais, com ações tanto *in vitro* como *in vivo* (Grootveld et al., 2004).

2.4.3 Administração da aplicação do ozônio

Na maioria das situações, múltiplos fatores contribuem para a resistência à reparação, entre eles, estão as dificuldades circulatórias, a profundidade de lesões e o comprometimento imunológico. A questão principal, no entanto, tem a ver com o fato de que essas condições favorecem a proliferação de microorganismos de varias espécies, com capacidade de produzir toxinas e possível resistência a antibióticos (Sunnan, 2005).

O ozônio pode ser administrado de diversas formas, além da via endovenosa que deve ser evitada devido ao risco de embolia (Bocci, 2005). A literatura descreve quatro formas principais de administração: autohemoterapia, insuflação retal, bolsa hermética de ozônio e aplicações tópicas por meio da água e do óleo ozonizados (Guerra et al., 1997; Grootveld et al., 2004; Bocci, 2006).

A forma de administração mais utilizada é a auto-hemoterapia maior (A-HT), o qual um volume pré-determinado de sangue é recolhido do paciente (200-270 ml), misturado ao volume equivalente de gás ($\text{O}_3 + \text{O}$) e reinfundido de forma

endovenosa. A concentração de ozônio deve respeitar a janela terapêutica entre 10 e 80 µg/ml (Bocci, 2005; Gracer; Bocci, 2005).

Devido à alta instabilidade e a toxicidade do ozônio, sua forma gasosa é mais segura para ser incorporada a fluidos como sangue, água, soluções isotônicas e óleos para aplicação clínica (Cardoso et al., 2000). Segundo Bocci (2006) há de ser claro que, ao usar o ozônio como terapia, deve-se evitar sua toxicidade que pode ser controlada cuidadosamente através do uso correto e preciso do gerador de ozônio equipado com um fotômetro sensível e padronizado que possa permitir que a concentração seja mensurada em tempo real.

2.4.4 Comportamento do ozônio

São muitas as dúvidas que trazem o conceito do uso do ozônio. Como qualquer outro gás, o ozônio dissolve-se fisicamente em água pura de acordo com a lei física de Henry, com relação ao que concerne a temperatura, pressão e sua concentração. Apenas nestas situações o ozônio não reage e, armazenado devidamente, quando apresentado sob a forma diluída em água permanece ativo por alguns dias. No entanto, curiosamente, quando em contato com fluidos orgânicos (plasma, linfa e urina) ele reage imediatamente segundo a reação (Bocci, 2006):

Em ordem de preferência, o ozônio reage com ácidos lipídicos poli-insaturados, antioxidantes como ácido ascórbico e ácido úrico e componentes tiol com grupos-SH como cisteína, glutamina reduzida e albumina. Dependendo da dose utilizada do ozônio, carboidratos, enzimas, estruturas do DNA e RNA também podem ser afetados (Bocci, 2006). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido por quase todas as células (Bocci, 2005), mas quando o ozônio na presença de componentes orgânicos e/ou inorgânicos reage instantaneamente, gera grande variedade de moléculas oxidadas, que desaparecem em segundos, mas provocam reações fisiológicas no local (Bocci, 2006). O ozônio, como molécula, possui elétrons na órbita externa, e apesar de não ser um radical, é muito mais reativo que o oxigênio. Wentworth et al (2003) postularam em seu trabalho que em pacientes

portadores de esclerose múltipla, as células do endotélio possuem a capacidade de produzir ozônio, mas seus resultados ainda necessitam de confirmação (Wentworth Jr P et al., 2003).

Níveis de ozônio próximos a 500 µg/m³ parecem inofensivos, porém deve-se considerar que qualquer inalação do ar implica dose de ozônio que imediatamente reage nas células das vias aéreas, interferindo no fluido de revestimento epitelial gerando as espécies reativas do oxigênio (Guerra et al.) e produtos oxidativos lipídeos (POL) (Bastacky et al., 1995)

Last et al (2005), em seus estudos mostraram que em ratos expostos a 1 ppm de ozônio no ar por 8 horas durante 3 dias consecutivos houve perda de 14% do peso original, 42% de diminuição de apetite e os animais entraram em estado caquético. Outro importante aspecto quanto à toxicidade pulmonar do ozônio é a reverberação que ele causa em todo o organismo, especialmente no sistema vascular, coração, fígado, cérebro e rins (Bocci, 2005; Last JA, 2005).

À primeira vista, as propriedades oxidantes do ozônio descartam a possibilidade que este gás possa fornecer algum efeito terapêutico. Entretanto, alguns pesquisadores estão avançando nos estudos onde, pela sua decomposição no sangue, o ozônio fornece energia intrínseca acumulada durante sua síntese (Bocci et al., 2009).

Estudos de Bocci (1999) no sangue elucidou bastante a atuação do ozônio nos fluidos orgânicos. O sangue é um composto ideal, pois contém plasma e células, especialmente os eritrócitos, hábeis em cooperar com as propriedades oxidantes do ozônio. O plasma é rico em redutores hidrofílicos, como ácido ascórbico, ácido úrico e glutathione.

O plasma também contém albumina que possui uma cadeia rica em grupos –SH e, portanto, é um potente oxidante (Larini A, 2004). Além disso, a presença de proteínas como a transferrina e a celuloplasmina anulam as reações de oxidação pela quelação de metais de transição (principalmente Fe²⁺ e Cu⁺) (Bocci et al., 1999).

Ainda, segundo Bocci et al (2009), os componentes importantes gerados *ex vivo* durante a reação inicial do ozônio com componentes do plasma ativam algumas vias bioquímicas nas células que foram analisadas após transfusão e avaliações do sangue do doador.

Ao contrário do oxigênio, o ozônio dissolve-se mais facilmente no plasma e instantaneamente reage com antioxidantes hidrossolúveis e com ácidos lipídicos poliinsaturados disponíveis levando à formação simultânea de 1 mol peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 2 mols de POL (Pryor, 1994; Pryor et al., 1995).

O peróxido de hidrogênio é a molécula fundamental das espécies reativas do oxigênio (ROS) que não é ionizada, mas é um oxidante capaz de atuar como mensageiro do ozônio responsável por desencadear inúmeros eventos biológicos e terapêuticos (Halliwell et al., 2000). O conceito que o H_2O_2 era sempre prejudicial ao organismo é constantemente reavaliado. No que se refere às questões fisiológicas, atua como regulador de transdução de sinais e representa mediador crucial da resposta de defesa imunológica do hospedeiro (Stone; Yang, 2006). Enquanto a exposição ao O_2 é ineficaz, o O_3 causa a geração de H_2O_2 e reação de quimiluminescência nos fluidos orgânicos. Contudo, enquanto em meio salino, há um aumento constante e progressivo de H_2O_2 , no plasma ozonizado, o H_2O_2 aumenta imediatamente, caindo muito rápido com meia vida de menos que 2 minutos, sugerindo que antioxidantes e traços de enzimas rapidamente atuam no H_2O_2 reduzindo-o nos fluidos (Bocci et al., 1998).

No sangue ozonizado a redução de H_2O_2 é tão rápida que experimentalmente é impossível mensurá-la. O H_2O_2 é capaz de facilmente atravessar a membrana celular, mas a concentração intracelular aumenta 1/10 no meio extracelular (Stone; Yang, 2006). Dependendo do local de concentração e do tipo de célula, o peróxido de hidrogênio pode também induzir a proliferação ou a morte celular, bem como a habilidade em iniciar o fluxo de cálcio estimulando caminhos que levam à sensibilização de elementos contráteis a ele. O H_2O_2 também está envolvido na atuação de proteínas quinases que estão implicadas na hipertrofia vascular (Ardanaz; Pagano, 2006). O peróxido de hidrogênio pode regular o tônus muscular causando constrições ou vasodilatações, embora permaneça incerto se ele atua também no fator hiperpolarizante derivado do epitélio (Stone; Yang, 2006; Ardanaz; Pagano, 2006).

Há duas questões a serem esclarecidas quanto ao modo do ozônio ativar diretamente ou indiretamente as células sanguíneas. A primeira questão sugere que o ozônio é muito reativo para penetrar dentro do tecido, apenas uma pequena fração da dose total de ozônio consegue passar inativo através da bicamada da membrana,

uma vez que, quando o sangue é misturado *ex vivo* com O_2-O_3 , dissolve-se rapidamente (Pryor et al., 1995; Bocci et al., 2009). A segunda sugere que é a formação rápida de gradiente de H_2O_2 que faz com que ocorra a ativação das células sanguíneas. Cerca de 10% do peróxido de hidrogênio penetra no citoplasma das células sanguíneas e representa o estímulo inicial. Dependendo do tipo de célula, vias metabólicas diferentes são concomitantemente ativadas nos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, resultando em inúmeros efeitos biológicos (Bocci et al., 2009).

O peróxido de hidrogênio gerado pelo ozônio contribui como molécula sinalizadora intracelular que interage com os diferentes tipos celulares. Nos eritrócitos é capaz de alterar a glicólise, aumentando a quantidade de formação de energia e o transporte de oxigênio para o interior dos tecidos. Nos neutrófilos e leucócitos pode ativar e estimular a síntese de interleucinas e citocinas favorecendo uma possível reativação fisiológica do sistema imunológico deprimido e nas plaquetas, proporciona o aumento de sua atividade e, como consequência, o aumento da liberação de autacóides e fatores de crescimento que contribui para a reparação de tecidos (Bocci, 2004b; Bocci, 2006).

Em baixas concentrações, as reações com POL (que são um dos produtos da ozonização dentro do plasma sanguíneo) podem ser estimuladoras e benéficas, atuando como transdutores de sinal molecular. Nesse sentido, segundo Pryor (1995), as POL causam a ativação de lipases específicas que ativam a liberação de mediadores endógenos da inflamação, aumentando a permeabilidade epitelial macromolecular, infiltração neutrofílica e hipersecreção do muco respiratório. Esses produtos de oxidativos lipídios (POL) também são responsáveis pela produção de vários compostos como o óxido nítrico que atuam na angiogênese (Pryor et al., 1995; Bocci, 2004b; Bocci, 2006; Bocci, 2008).

O ozônio também pode induzir resposta antioxidante capaz de reverter o stress crônico oxidativo e, à primeira vista, isso parece ser um conceito paradoxal. Entretanto, este conceito tornou-se comum nos reinos animais e vegetais. Qualquer mudança do ambiente, seja ele externo ou interno, perturba a homeostase celular, mas se o stress é tolerável, ou cuidadosamente calibrado em sua intensidade, a célula ou o organismo como um todo possuem a capacidade de se adaptarem e sobreviverem. Se o stress está em excesso ou a célula já se encontra danificada, a própria programa sua morte (Ranieri et al., 2001).

O conceito de estresse oxidativo inclui hipertermia, hipóxia, isquemia, hipoglicemia e modificações no pH. Assim, em dose correta e segura, o ozônio representa um stress oxidativo agudo não deletério que induz uma resposta celular antioxidante capaz de reverter o estresse oxidativo crônico existente, ou seja, ajuda a normalizar o balanço redox alterado em várias doenças como câncer, aterosclerose, catarata, maculopatia, Alzheimer e Parkinson. Essa atuação pode melhorar a circulação (vasodilatação local e angiogênese) e o suporte de oxigênio, favorecer o metabolismo e a liberação de citocinas, autacóides e fatores de crescimento que, juntamente com a atividade antimicrobiana que o ozônio possui, representam elementos cruciais no tratamento de diversas patologias metabólicas, inflamatórias, infecciosas ou ainda neoplásicas (Bocci, 1996; Bocci, 2006).

A aplicação do ozônio, tanto como forma local ou sistêmica, pode acelerar a reparação tecidual devido ao fato do ozônio interagir nos diversos componentes celulares (Bocci 1996).

Os efeitos benéficos do ozônio são aceitos em função da atuação contra a infecção dos microorganismos, melhora na cicatrização de feridas cutâneas além de aumentar a oxigenização na área infectada (Lim et al., 2006).

2.4.5 Mecanismos de ação do ozônio

A exposição do tecido a ser reparado pelo ozônio está associada com a ativação com o fator de transcrição da via NF κ B, que é importante regulador da resposta inflamatória e eventualmente de todo o processo de reparação tecidual (Valacchi et al., 2005).

Foi demonstrado que grandes quantidades de PDGF e TGF- β -1 são liberadas de plaquetas no plasma heparinizado de pacientes com membros isquêmicos após ozonização (Bocci, 1999; Valacchi et al., 2005). Pesquisas mostram que houve aumentos substanciais do estado estacionário dos níveis de mRNA de TGF- β -1 em fibroblastos que foram cultivados com células bronco-epiteliais após exposição ao ozônio. O H₂O₂ potencialmente induz a expressão de VEGF em queratinócitos humanos que podem estimular a reparação tecidual, assim, estudos indicam que o

ozônio está relacionado com os fatores de crescimento que atuam na reparação (Kim et al., 2009).

Segundo Kim et al (2009), o ozônio afeta a expressão de citocinas pró inflamatórias, como Interleucina-1 (IL-1) e Fator- α de Necrose Tumoral (TNF- α), vias de respostas de inflamação como ciclo-oxigenase-2 (COX-2), e ativação gênica de queratinócitos através da via NFkappa β . Foi demonstrado que a exposição ao ozônio aumenta a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e de CK10, em queratinócitos suprabasais bem diferenciados. Estes resultados sugeriram que o ozônio induz a proliferação de queratinócitos e sua diferenciação, afetando a biologia da derme. Seus estudos ainda afirmaram que o ozônio atua na reparação tecidual aguda diretamente ou indiretamente via síntese de colágeno e da proliferação fibroblástica durante a formação de tecido de granulação. Os resultados mostram que na fase inicial da remodelação tecidual após 7 dias de reparação, houve aumento da intensidade de fibras colágenas e aumento significativo de fibroblastos no limite e no centro das lesões ozonizadas quando comparadas ao grupo controle do mesmo estudo.

Os fibroblastos são reconhecidos por possuir papel fundamental na reepitelização, síntese de fibras colágenas, regeneração da matriz extracelular, remodelamento de feridas e por liberar fatores de crescimento endógenos tais como FGF, PDGF, TGF- β e VEGF (Vincent, 2003). Pesquisas recentes sugeriram que o ozônio induziu a expressão de PDGF e TGF- β em queratinócitos da epiderme bem como de fibroblastos do sítio da injúria,. E estes dados estão associados com a geração de H₂O₂ através da ozonização, que pode diretamente induzir a expressão da VEGF e/ou indiretamente induzi-la pela indução da heme-oxigenase-1. É importante lembrar que o VEGF é a principal citocina da vascularização na fase tardia da remodelação (Kim et al., 2009) e a heme-oxigenase-1 é a enzima atuante na defesa enzimática. Quando induzida, esta cataliza o primeiro e limitante passo na degradação oxidativa depois de ser quebrada em heme livre dentro da molécula de ferro. As ações sinalizadoras de monóxido de carbono (CO), as propriedades antioxidantes da biliverdina/bilirrubina e o seqüestro da molécula de ferro pela ferritina contribuem para os efeitos antiinflamatórios da heme-oxigenase-1(Pae; Chung, 2009).

A hipóxia tecidual, causada por vasculopatia periférica ou interrupção vascular, representa uma importante limitação para a reparação tecidual. Fatores que podem aumentar o suplemento de oxigênio neste tecido, como câmara hiperbárica, podem favorecer e acelerar a reparação. Estudos mostraram que a aplicação tópica de oxigênio sobre feridas dérmicas experimentais aumentou a quantidade de oxigênio disponível no tecido superficial, acelerando clinicamente o fechamento da ferida e favorecendo histologicamente a angiogênese, sem efeito tóxico (Fries et al., 2005).

Traina (2008) avaliou *in vivo* os efeitos biológicos do ozônio diluído em água, em duas concentrações diferentes, na reparação tecidual de feridas dérmicas induzidas em ratos após irrigações cirúrgicas trans e pós operatórias. Seus resultados permitem concluir que além da ausência da toxicidade, a água ozonizada interferiu no processo da reparação tecidual de forma dependente da concentração, possibilitando maior rapidez na redução da área, com uso de uma contração tecidual mais regular que também mostrou um aumento inicial da resposta inflamatória com posterior diminuição da mesma (Traina, 2008).

Como o ozônio e os reagentes do sangue (plasma e células antioxidantes) estão precisamente calibrados, no estudo de Gracer e Bocci (2005), os efeitos biológicos por eles constatados foram definitivos e não apresentaram toxicidade.

Um aspecto interessante do ozônio é que a ativação dos eritrócitos ou plaquetas aumenta em ambos a entrega de oxigênio e a liberação de fatores de crescimento. Quando o sangue ozonizado foi reinjetado dentro do tecido inflamado, ele levou à normalização do metabolismo, da proliferação celular e da síntese de matriz extracelular, aumentando a quantidade de leucócitos locais e a liberação de fatores de crescimento para a construção da matriz extracelular e reconstrução tecidual, induzindo também a síntese proteínas, principalmente a heme-oxigenase-I (Gracer; Bocci, 2005).

2.4.6 Indicações da aplicação do ozônio

É conhecido que existem contra-indicações para o uso da aplicação do ozônio em pacientes, tais como infarto recente do miocárdio, hemorragia em algum órgão,

gravidez, hipertireoidismo, trombocitopenia e alergia ao ozônio (Seidler et al., 2008), entretanto, existem inúmeras indicações para seu uso já descritas na literatura (Bocci, 2005).

Diversos autores estudaram o uso do ozônio e enumeraram diversas patologias que podem ser tratadas. Bocci (2005), Tylicki et al (2001), Clavo et al (2003) Biedunkiewicz et al (2004) citam isquemia crônica de membros e úlcera crônica cutânea devido a isquemia e diabetes. Nesses casos o tratamento ortodoxo é realizado com infusões prostanoídes, entretanto, os benefícios são menores e o custo mais elevado quando comparados com a aplicação do ozônio. Outras aplicações incluem a forma atrófica de degeneração macular em função da idade (FADM), outras patologias onde o uso do ozônio pode ser eficiente quando combinado com outras terapias como: doenças infecciosas agudas e crônicas, osteomielite, abscessos com fístulas, úlceras crônicas, pés diabéticos, queimaduras, feridas infectadas, peritonite, picadas de inseto, escaras de decúbito, infecções herpéticas, doenças autoimunes (como esclerose múltipla, artrite reumatóide e Doenças de Crohn), neuropatias, doenças da pele (dermatite e psoríase), doenças ortopédicas, síndrome de fadiga crônica, fibromialgia, periodontites e infecções bucais. Por fim, o ozônio também pode ser indicado em situações emergenciais, como as que ocorrem após extensos traumas, queimaduras e septicemias (Clavo et al., 2003; Biedunkiewicz et al., 2004; Bocci, 2005).

Existem microorganismos que em muitos pacientes promovem resistência ao antibiótico. A ineficiência na penetração dos antibióticos em áreas infectadas são responsáveis por muitos casos de óbito nos hospitais, mesmo nos países mais desenvolvidos. Em alguns casos, autohemoterapia ozonizada associada com a aplicação tópica de óleo ozonizado promove rápida desinfecção nesses casos e aumenta a chance de cura e qualidade no tratamento. Infelizmente, o uso de óleo ozonizado necessita de mais pesquisas para sua aplicação, preparação e resultados para se afirmar definitivamente como tratamento (Bocci, 2005).

Infecções herpéticas e herpes zoster podem ser tratadas com injeção intramuscular de autohemoterapia ozonizada utilizada como autovacina e quando associada à terapia tópica com óleo ozonizado torna-se muito efetiva na prevenção e recidivas nesses casos. Esta abordagem quando associada com o aciclovir, pode acelerar a cicatrização na maioria dos pacientes (Bocci, 2005; Oxman et al., 2005).

Em outras patologias isquêmicas crônicas (isquemia cerebral e cardíaca) a aplicação do ozônio exerce efeitos benéficos porque aumenta a oxigenação, a quantidade de glucose e a entrega de ATP nas células dos tecidos isquêmicos. Assim, haverá aumento da angiogênese, da regulação da expressão de enzimas antioxidantes e da heme-oxigenase I e possivelmente a atração de células tronco da medula óssea que promovem a neovascularização e a regeneração tecidual (Barnes; FY, 2002; Bocci, 2005; Bocci, 2006).

Estudos preliminares com pacientes cardiopatas em estágio final, onde cirurgias de revascularização e transplante não foram eficientes, mostraram que o uso do ozônio quando associado com a terapia convencional estimula os pacientes perante o péssimo prognóstico (Bocci, 2005).

Em patologias pulmonares como enfizema, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, o tratamento é o uso de drogas combinadas como corticoesteroides e agonista β_2 de longa ação (Barnes; FY, 2002). Infelizmente, estas drogas prolongam por um tempo a vida do paciente, contudo não impedem a progressão da doença. O uso do ozônio é baseado na reinfusão sanguínea. Nesses casos, os POL presentes em baixa concentração atuam na superfície endotelial, aumentam a liberação de prostaciclina e óxido nítrico (NO) enquanto a liberação de endotelina-1 é deprimida (Bocci et al., 1999; Valacchi; Bocci, 2000).

A liberação de NO e nitrosothiols-S (formado quando o NO reage com thiols em proteínas como albumina) ocasiona vasodilatação (Barnes; Liew, 1995; Stamler, 2004). Secundariamente, a entrega de oxigênio nos tecidos isquêmicos é aumentada e esse aumento progressivo de enzimas oxidantes e heme oxigenase-I neutraliza o stress crônico oxidativo típico dessas patologias pulmonares. Além disso, a estimulação do sistema imune ajuda a conter infecções pulmonares recorrentes e crônicas (Bocci, 2006).

A autohemoterapia ozonizada quando combinada com a aplicação tópica de óleo ozonizado mostram-se muito útil em distúrbios metabólicos em pacientes com diabetes tipo 2 controlados que sofrem de úlceras crônicas com dificuldades de cicatrização. Não há dúvida que esses pacientes preferem o uso do ozônio a utilização de câmeras hiperbáricas e terapias com larvas no locais (maggot)(Lipsky, 2004).

Nas patologias resistentes à quimioterapia e terapias relacionadas à fadiga pelo câncer em pacientes pré-terminais, pesquisadores mostraram que sessões de aplicação do ozônio (autohemoterapia) duas vezes por semana durante seis semanas ocasionou o aumento da qualidade de vida, porém sem impedir a progressão da doença. Por outro lado, quando associada à quimio e radioterapia pode contribuir positivamente após cirurgias, não só potencializando o efeito citotóxico dos medicamentos mas também induzindo a reposta antioxidante e quimiotoxicidade (Gonzalez et al., 2004).

Em doenças ortopédicas, como dores da coluna, a injeção intra-discal de oxigênio-ozônio mostrou sucesso do tratamento em 75% dos pacientes, sendo uma das poucas técnicas modernas capazes de resolver o problema de hérnia de disco com uma abordagem pouca invasiva (Andreula et al., 2003; Bocci, 2005).

Procedimentos não-invasivos, minimamente invasivos através de injeção percutânea ou cirurgias representam uma gama de tratamentos disponíveis para o tratamento de hérnia de disco. Tratamentos não-invasivos são, sem dúvida, a primeira escolha para o paciente, entretanto, quando não há sucesso na escolha, injeções minimamente invasivas ou cirurgias são procuradas, sendo a primeira opção a segunda mais cogitada. Pesquisas avançaram no intuito de promover e oferecer resultados associados à tolerância ao baixo-custo. A terapia com oxigênio-ozônio é um dos diferentes tratamentos atualmente acessíveis (Andreula et al., 2003), pois o ozônio com suas propriedades, como aumento da glicólise, efeito nas células sanguíneas, ação moduladora e efeitos analgésicos e antiinflamatórios esclarecem sua ação em patologias na região lombar (Viebahn, 1994). A dose administrada, nestes casos, deve ser crucial para o sucesso do tratamento (Mirabelli et al., 1988) não devendo exceder a capacidade de metabolização das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) e da glutadiona que previnem o acúmulo de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (Mirabelli et al., 1988; Bocci et al., 2009).

Na ortopedia, geralmente o ozônio administrado, encontra-se sob a forma de mistura de gás oxigênio-ozônio, em concentrações não tóxicas que variam de 1 a 4µg de ozônio por mililitro de oxigênio (Viebahn, 1994). Estudos empíricos realizados *in vivo* em coelhos e *in vitro* em espécimes de tecido discal de humanos demonstrou que para uma administração bem sucedida, a concentração ideal de

ozônio por mililitro de oxigênio é 27 μ g. Nesta concentração, o ozônio possui efeito direto na composição de proteoglicanas do núcleo pulposo do disco da coluna vertebral, resultando na liberação de moléculas de água e subsequente degradação celular da matriz, no qual há substituição por tecido fibroso num intervalo de aproximadamente 5 semanas. Juntos, estes eventos resultam na redução do volume discal (Iliakis et al., 2001).

A ação antimicrobiana do ozônio já foi atestada por diversos autores (Bocci et al., 2009). Esse gás possui um poderoso efeito desinfetante com amplo espectro de ação, é um potente oxidante que age na formação de radicais livres e é mais efetivo em alguns microorganismos mais sensíveis que outros. Sua atuação foca-se na inibição da atividade metabólica, na mudança da cápsula e na destruição irreversível do DNA viral, além do estímulo para produção de anticorpos (Stübinger et al., 2006).

Além de todas estas características, o ozônio produz oxidação letal no protoplasma bacteriano, por produzir alteração dos ácidos gordurosos insaturados da parede bacteriana, tornando-se microbicida, bactericida, fungicida e parasiticida. A ação antiinflamatória e analgésica do ozônio ocorre pela regulação do metabolismo celular, os mecanismos oxidativos regulares favorecem a oxigenação tecidual bem como estimulam a função imunomoduladora. O aumento do oxigênio acontece pelas reações oxidativas com os ácidos gordurosos insaturados da membrana fosfolipídica, que geram peróxidos hidrofílicos estimulando a formação de substâncias desoxigenantes, as quais atuarão sobre as oxi-hemoglobinas liberando oxigênio (Buliés, 1996).

2.4.7 Aplicação do ozônio na Odontologia

Na odontologia, o ozônio mostra-se de importância no que concerne às suas propriedades biológicas. Sua aplicação na cavidade bucal ocorre tanto sob a forma de gás como na forma líquida ou, ainda, associado ao óleo de girassol (Baysan; Lynch, 2004; Holmes, 2003).

As propriedades microbiológicas e metabólicas do ozônio, em fase gasosa ou em fase líquida, possuem vantajosa função desinfetante contra inúmeros

microorganismos orais (Azarpazhooh; Limeback, 2008). Estudos têm mostrado a eficácia do ozônio como poderoso agente contra bactérias, fungos, protozoários e vírus (Arita et al., 2005).

O potencial oxidante do ozônio induz a destruição da parede celular e das membranas citoplasmáticas das bactérias e dos fungos que ocorrem na boca. Durante este processo, o ozônio ataca glicoproteínas e glicolípídeos além de outros aminoácidos que bloqueiam o sistema de controle enzimático da célula (Celiberti et al., 2006). Isto resulta no aumento da permeabilidade da membrana, o elemento chave para a viabilidade celular, levando o microorganismo a imediata interrupção de suas funções vitais. As moléculas resultantes da quebra do ozônio podem entrar na célula facilmente e causar a morte do microorganismo (Arita et al., 2005).

O ozônio também pode atacar muitas biomoléculas, tais como cisteína, metionina e resíduos de histidina de proteínas (Holmes, 2003) pela oxidação das biomoléculas caracterizadas em patologias dentais. Esse gás também possui efeito interruptivo da bactéria cariogênica através da eliminação de sua característica acidogênica que é a de produzir ácido pirúvico. O ozônio consegue descarboxilar este ácido em ácido acético (AbuNaba'a et al., 2004).

Algumas pesquisas foram realizadas no intuito de se descobrir em quais bactérias o ozônio realmente atua na cavidade oral. Evidências mostraram-se controversas, enquanto alguns autores não encontraram eficácia nenhuma (na forma aquosa e gasosa), outros autores obtiveram sucesso em bactérias gram-positivas e gram-negativas da microflora bucal além de *cândida albicans* (Muller et al., 2007; Walker, 2003).

Foi constatado também alto nível de biocompatibilidade do ozônio diluído em água nas células epiteliais, fibroblastos da gengiva e células do ligamento periodontal. Isso é fundamental para procedimentos como reimplantação de elementos dentais avulsionados (Ebensberger et al., 2002; Huth et al., 2006).

Estudos *in vitro* foram realizados para investigar o efeito bactericida do ozônio quando comparado com 2,5% de hipoclorito de sódio (Nagayoshi et al., 2004; Estrela et al., 2007; Muller et al., 2007). Nagayoshi et al (2004) encontraram resultados de atividade antimicrobiana semelhantes nas duas substâncias (contra *Enterococcus faecalis* e *S. mutans*) e baixo nível de toxicidade da água ozonizada quando comparada com o hipoclorito de sódio 2,5%. Por outro lado, Hems et al (

2005) encontraram no hipoclorito de sódio atividade antimicrobiana superior ao ozônio diluído em água contra *E.faecalis* em culturas; já o ozônio sob forma gasosa não obteve efeito algum terapêutico (Hems et al., 2005).

Na dentística, o ozônio é utilizado como tratamento profilático antes do selante sem impacto negativo às propriedades físicas do esmalte. O efeito bactericida do ozônio pode contribuir para a longevidade das restaurações bem como para a limpeza de próteses totais evitando a contaminação da mesma por microorganismos (Azarpazhooh; Limeback, 2008).

Existem evidências na efetividade da aplicação da água ozonizada associada ao amino-álcool para a descontaminação de superfícies de implantes dentários (Suzuki et al., 1999).

Na área de traumatologia, estudos mostraram o efeito do ozônio sob forma gasosa em pacientes com osteomielites de cabeça e pescoço, como terapia complementar ao uso de antibióticos, cirurgia e câmaras hiperbáricas (Steinhart et al., 1999). Segundo Agrillo et al (2007), o ozônio é efetivo nestes casos por estimular e ou preservar o sistema antioxidante endógeno, bloquear a via oxidativa xantina-xantina, ativar a síntese de radicais livres e por estimular a circulação sanguínea, aumentando a concentração de eritrócitos e hemoglobina, a diapedese e a fagocitose dos macrófagos. Isto é particularmente visto em vasos de menor calibre, como os que envolvem a circulação na mandíbula e na maxila. Estes vasos mostram um rápido preenchimento de elementos do sangue e notável ativação da circulação. Além disso, o ozônio estimula reações biológicas, em particular, o processo de oxigenação tecidual, cálcio, fósforo e metabolismo do ferro com a conhecida ação antimicrobiana e analgésica, não possuindo efeitos tóxicos nos tecidos quando em doses terapêuticas (Agrillo et al., 2007).

3 PROPOSIÇÃO

A proposição desta pesquisa foi avaliar *in vivo* os efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas ósseas através da expressão imunohistoquímica das principais proteínas da matriz extracelular: Osteopontina, Osteonectina, Sialoproteína Óssea e Colágeno tipo I.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA EXPERIMENTAL

Foram utilizados 16 ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), machos, com peso entre 250 e 300 gramas e idade entre 45 a 60 dias. Durante todo o período da pesquisa, os animais foram mantidos em condição padrão de alimentação com ração e água *ad libitum*. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), que emitiu parecer favorável à sua realização, protocolo nº22/2009 (anexo A).

4.2 PROCEDIMENTOS REALIZADOS

4.2.1 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico dos animais foi realizado sob protocolo do Departamento de Cirurgia e Bucomaxilo Facial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. E consta de anestesia geral pela aplicação do anestésico via intramuscular na dose de 1ml/kg (Cloridrato de Cetamina, Dopalen® - Vetbrands) e do relaxante muscular via intramuscular na dose de 0,3 ml/kg (Cloridrato de Xilazina, Rompum® - Bayer SA). Em seguida, foi realizada a tricotomia na perna esquerda do animal na região do fêmur. Uma vez tricotomizado, a antisepsia foi realizada com Polivinilpirrolidona iodo a 10% diluído em água, Povidine® - Johnson Diversey.

A execução do procedimento cirúrgico compreendeu a realização de incisão na perna esquerda do animal de aproximadamente 25 mm e excisão de 5 mm de profundidade e excisão da derme e subcutâneo, expondo a fáscia muscular

adjacente, onde foi realizada a perfuração do fêmur com broca Trefina de 2 mm por meio de um motor de baixa rotação até retirada do fragmento ósseo. Após a realização das feridas cirúrgicas, os animais foram divididos em dois grupos para 7 dias e 14 dias com ozônio (7d/cO₃, 14d/cO₃) e dois grupos para 7 e 14 dias sem ozônio (7d/sO₃, 14d/sO₃).

As irrigações, nos 4 grupos indicados, foram realizadas com fluxo constante de intensidade e velocidade regulares e foram realizadas por meio de seringas de 20 ml e agulhas (0,7 x 30mm) estéreis descartáveis, com aspiração também constante.

As perfurações foram irrigadas durante o procedimento cirúrgico por meio de 100 ml de água Milli-Q® com 4 ppm de ozônio diluído. O grupo S/O₃ (grupo controle) foi submetido ao mesmo procedimento com a utilização de água Milli-Q® sem a diluição do ozônio. Após a irrigação, os procedimentos de síntese foram realizados por sutura da ferida cirúrgica com fio de seda 3.0.

Os animais foram sacrificados após 7 e 14 dias de pós-operatório, por inalação de monóxido de carbono (CO). Em cada período foram sacrificados 8 animais, que corresponderam a 4 amostras de cada um dos 4 grupos totalizando um total de 16 animais. Após o sacrifício, foi obtida uma peça cirúrgica da região submetida à cirurgia para obtenção do material para fixação.

Os espécimes removidos foram fixados em formol 10% por no mínimo 24 horas e, posteriormente, descalcificados através de imersão em solução de EDTA 10% (pH 7.4) durante 4 semanas. As peças descalcificadas foram cortadas ao longo do seu eixo, centralmente à lesão realizada pela broca trefina de 2 mm, processados histologicamente para inclusão em parafina. Seguiu-se a realização de cortes semi-seriados 4 µm em longo eixo, coloração de Hematoxilina- Eosina (HE) e reações de imunoistoquímica.

Todos os procedimentos experimentais foram criteriosamente realizados dentro dos princípios gerais e fundamentais de cirurgia, junto ao Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Prótese e Traumatologia da FOUSP. O ato operatório transcorreu sem contaminação e com o menor trauma possível e foi realizado por um único cirurgião. As peças cirúrgicas obtidas após o sacrifício dos animais foram processadas junto à Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da FOUSP.

4.2.2 Produção de água ozonizada

A água ozonizada foi produzida por meio do gerador de ozônio (Ozone & Life[®] 3.0), utilizado nas potências de 10. A fonte de oxigênio empregado foi proveniente de cilindro de oxigênio medicinal com fluxo de 1 mL/min ajustado e regulado por fluxômetro de precisão (Rotarex[®], USA). Nestas condições, a quantidade de ozônio produzida pelo gerador era de 47,7 mg O₃/L e 13,0 mg O₃/L. O ozônio gerado era transportado por mangueira de silicone para 2 litros de água Milli-Q[®] (Millipore), contida em um lavador de gás em vidro com 1,58 m de altura. O tempo de ozonização foi cronometrado e padronizado em 10 minutos.

A concentração final do O₃ na água foi monitorada imediatamente após sua produção e previamente à sua utilização, empregando o analisador colorimétrico pelo kit ChemetsTM (Chemetrics, INC-USA) (modelo GM6000), garantindo uma dose precisa e conhecida. Esta concentração aferida correspondia a 4,0 ppm.

Previamente a cada produção da água ozonizada que foi utilizada na pesquisa, o lavador de vidro empregado era submetido à ozonização de 2 litros de água Milli-Q[®] em potência máxima do gerador com fluxo de oxigênio de 1 ml/min por 5 minutos, para proporcionar a limpeza do vidro. As temperaturas ambientes da sala e a umidade relativa do ar foram monitoradas todos os dias durante a produção da água ozonizada e correspondiam aproximadamente à 26°C e 66% de umidade.

Após a produção da água ozonizada, esta era coletada por meio de mangueiras de silicone estéreis e acondicionada em recipientes de vidros com tampa de Teflon[®] também estéreis, até o momento do seu uso, que ocorreu no máximo em até uma hora da sua ozonização. Após certo período dos procedimentos cirúrgicos, o recipiente foi acondicionado sob refrigeração a temperatura em torno de 8 a 10°C. Para o preenchimento das seringas utilizadas para irrigação, a água era condicionada em recipientes de vidro também estéreis.

4.2.3 Análise histomorfológica

Os cortes corados com HE foram analisados em microscópio de luz convencional (Olimpus[®] CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan) sob foco fixo e

clareza de campo, com aumento final de 400X. Esta análise foi realizada em duplo cego, por dois observadores independentes que não conheciam os dados das amostras. Empregou-se uma escala arbitrária de expressão classificada de 0 a 3 para presença de vasos neoformados, presença de trabéculas ósseas maduras e imaturas, presença de osteoblastos e osteoclastos:

0= ausente

1= pouco

2= moderado

3=numerosos

4.2.4 Análise imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram realizadas no laboratório de imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da FOUSP.

Para tanto, foi utilizada a técnica de estreptoavidinabiotina-peroxidase e foram utilizados os anticorpos policlonais desenvolvidos em coelhos contra ratos: Osteopontina (OPN), Osteonectina (ONC), Sialoproteína Óssea (BSP) e Colágeno tipo I. Os anticorpos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Larry W. Fisher, pesquisador da Matriz Biochemistry Unit, Craniofacial and Skeletal Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA.

Tabela 4.1 - A titulação e o tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados e o eventual pré-tratamento realizados

Anticorpo	Título	Incubação	Tratamento
Colágeno I ^a	1:300	30 min	Tripsina 30 min
OPN ^a	1:1200	40 min	Sem tratamento
BSP ^a	1:800	40 min	Sem tratamento
ONC ^a	1:600	40 min	Sem Tratamento

^a Dr. Larry W. Fisher, pesquisador da Matriz Biochemistry Unit, Craniofacial and Skeletal Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA.

Os cortes de 4 µm de espessura foram obtidos dos espécimes emblocados em parafina e estendidos em lâmina de vidro previamente tratadas com solução de 3-aminopropiltriethoxilano (Sigma St. Louis, MO, USA) 10% em etanol absoluto.

Estes cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, sendo que o primeiro foi por 30 minutos em estufa à temperatura de 60°C e o outro por temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se à reidratação dos cortes em série de etanol com concentrações descendentes (3 vezes em etanol absoluto, 95%, 85%) em banhos de 5 minutos cada. Para remoção do pigmento formólico foi realizado um banho de 10 minutos em hidróxido de amônio 10% em etanol 95%, seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos de água destilada.

Como necessário para o anticorpo primário Colágeno tipo I foi realizado o pré-tratamento com tripsina, seguido de dois banhos de água destilada por 10 minutos. Os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena tecidual com solução de peróxido de hidrogênio 6% e metanol na proporção 1:1 em 2 banhos de 15 minutos cada. Posteriormente foram realizadas lavagem em água corrente por 10 minutos, 2 banhos de água destilada e 2 banhos de 5 minutos em solução tampão de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) 0,5 M, pH 7,4.

Para o bloqueio de reação inespecífica os cortes foram incubados com soro normal suíno (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA) 30% diluído em solução tampão TRIS-HCL. O bloqueio foi realizado em câmara úmida à temperatura ambiente por 30 minutos para reações contra OPN, ONC, BSP. Após esse período, realizou-se 1 banho em solução tampão de TRIS-HCL por 10 minutos.

A incubação dos anticorpos primários contra OPN, ONC, BSP e Colágeno tipo I foi procedida manualmente sendo as lâminas mantidas em câmara úmida em geladeira a 4°C de acordo com as titulações e o tempo de incubação mencionados.

Como soro secundário e complexo terciário foram utilizados o kit Envision Dako®-LSAB (Corporation, Glostrup, Denmark) por 30 minutos. A revelação da reação foi feita por imersão em solução de cromógeno diaminobenzidina (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical® CO., St. Louis, MO/USA) por 10 minutos. Os cortes foram então lavados em TRIS pH 7,6 e água destilada e contra-corados com Hematoxilina de Mayer por 10 minutos. Posteriormente lavados novamente por 10 minutos em água destilada.

A seguir as lâminas foram desidratadas em um série de etanol em concentrações crescentes (70%, 75%, 80%, 85%, 90% e 95%) com banhos de 3 minutos cada e 3 vezes em etanol absoluto em banhos de 5 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas automaticamente no equipamento Tissue Tek® SCA com fita polimétrica Tissue Tek® SCA *coverslipping film* 4770, que simula uma lamínula de vidro.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan) sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400X. Este estudo foi realizado sob forma semi-quantitativa, em duplo cego por dois observadores calibrados e independentes para identificar a presença ou ausência de marcação para cada anticorpo e seu padrão de expressão. A imunorreatividade foi verificada nas seguintes áreas: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, matriz osteóide e trabéculas imaturas.

As marcações foram classificadas em:

- negativas (-)
- fracamente positiva (+)
- moderada (++)
- intensa (+++)

De acordo com a intensidade de impregnação da substância cromógena e com a extensão da marcação. A reação foi considerada positiva quando houve coloração castanha e negativa para as regiões e células que não apresentaram tal coloração. A designação fracamente positiva foi aplicada nos casos em que haja pouca intensidade do cromógeno ou quando a marcação não se apresentar uniforme exibindo positividade em áreas focais.

Para realização de análise estatística, para esses dados foram atribuídos números de forma que ao resultado negativo (Valacchi et al.) foi atribuído 0, ao resultado fracamente positivo foi atribuído 1, ao resultado positivo foi atribuído 2 e por fim, ao resultado fortemente positivo foi atribuído o valor 3.

4.2.5 Análise estatística

Os resultados observados para as expressões das proteínas não colágenas ONC, BSP e OPN e o colágeno tipo I, foram submetidos a cálculo de medidas de tendência central (média, mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão).

Para comparação entre todos marcadores segundo os itens analisados previamente especificados (osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, matriz osteóide e trabéculas imaturas) e a expressão de cada anticorpo utilizado foi realizado o teste de Kruskal Wallis (programa de análises Bioestat 5.0).

Com intuito de realizar comparações entre os diferentes grupos (7 dias com ozônio comparado com 7 dias sem ozônio e 14 dias com ozônio comparado com 14 dias sem ozônio), foi realizado o teste de Mann-Whitney (programa de análises

Bioestat 5.0). para todas as combinações possíveis de comparação para cada proteína.

Para todos os testes foi estabelecido um erro $\alpha=5\%$, isto é, os resultados dos testes foram considerados estatisticamente significativos somente quando o $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DA ÁREA DA FERIDA

5.1.1 Animais sacrificados após 7 dias

No grupo que utilizou o ozônio, observou-se no centro da lesão intensa celularidade formada por células fusiformes grandes numerosos vasos sanguíneos, extensas áreas hemorrágicas. Trabéculas ósseas imaturas estão presentes mas somente nas regiões laterais da ferida, sendo o centro formado unicamente por células em proliferação à semelhança de um calo ósseo no início de formação. No grupo controle trabéculas ósseas estão presentes em maior número e são marcadamente imaturas com linhas de aposição e reposição evidentes. É possível diferenciar com maior clareza os osteoblastos e osteócitos e não há hemorragia difusa evidente. Já no grupo tratado, interessantemente, osteoclastos encontram-se dispersos por toda a área sendo remodelada.

É importante mencionar que durante as cirurgias os quatro animais do grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico no mesmo dia em sequência. Com isso, do terceiro ao quarto animal, houve o resfriamento da garrafa contendo o ozônio diluído em água, supostamente, no intuito de manter as propriedades do ozônio. Percebeu-se que estes últimos animais, não mostraram as mesmas características dos dois primeiros animais, cujo ozônio diluído em água encontrava-se à temperatura ambiente. Eles apresentavam características idênticas aos animais do grupo controle que foram irrigados somente com água MilliQ®.

5.1.2 Animais sacrificados após 14 dias

Nos animais que receberam o ozônio observou-se que a reparação da ferida aparentemente foi mais lenta quando comparados com o grupo controle sacrificados

na mesma data experimental. As trabéculas ósseas encontram-se ainda imaturas, porém já mostrando maior remodelação e a medula óssea adjacente à área da ferida encontra-se permeando essas trabéculas em ambos os grupos. Porém, no grupo controle, as trabéculas ósseas são menores e mais maduras, há maior quantidade de medula óssea ocupando e substituindo as trabéculas em grande parte da lesão. Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são encontrados nos dois grupos. É importante salientar que as áreas de trabéculas imaturas aparentemente estão sendo remodeladas a partir das paredes laterais da ferida.

Aqui, aplica-se novamente o fato de que, dos 4 animais do grupo que receberam ozônio, os dois últimos animais que sofreram a cirurgia foram irrigados com o ozônio diluído em água sob refrigeração e por isso não obtiveram os mesmo resultados dos dois primeiros animais mostrando, ao contrário, as mesmas características dos animais de 14 dias que sofreram irrigação somente com água MilliQ®.

Na tentativa de demonstrar didaticamente o atraso na reparação da ferida nos casos utilizando-se o ozônio diluído em água, utilizou-se uma escala arbitrária de expressão analisando a possível presença e/ou ausência de alguns parâmetros previamente descritos na seção de materiais e métodos. Esses dados estão explicitados na tabela 5.1 a seguir e são interpretados nos parágrafos seguintes.

Tabela 4.2 - Análise histomorfológica da área central da ferida dos animais sacrificados 7 e 14 dias com e sem ozônio diluído em água MilliQ®

HE	7d s/O3	7dc/O3	14ds/O	14c/O3
			3	
Vasos neoformados	1	3	1	2
Trabéculas ósseas:				
• Maduras	0	0	1	2
• Imaturas	3	3	2	3
Quantidade de:				
• Osteoblastos	3	3	3	2
• Osteoclastos	1	3	2	2

A quantidade de vasos neoformados é marcadamente maior nos grupos que fizeram uso da água ozonizada tanto em 7 quanto em 14 dias quando comparados com os grupos controles, visto que em ambos tempos experimentais os grupos controles receberam pontuação menor que os grupos tratados. Ainda nesse sentido, a presença de vasos neoformados diminui de 7 para 14 dias no grupo tratado, o que sinaliza para a reparação tecidual ainda que mais atrasada nesses grupos.

Com relação às trabéculas ósseas, tanto os casos tratados quanto os não tratados não mostraram trabéculas maduras nos 7 primeiros dias de avaliação. No entanto, é importante salientar que no grupo tratado com ozônio, a região central da lesão era composta unicamente por células enquanto o grupo sem tratamento já apresentava presença de trabéculas ósseas nessa região. Assim, trabéculas imaturas eram bastante presentes nesse período de avaliação, mas é imperioso salientar que no grupo tratado, essas trabéculas localizavam-se somente nas áreas laterais da ferida cirúrgica em contato com a medula óssea enquanto que no grupo controle, essas trabéculas já preenchiam a totalidade da ferida.

Foram observados numerosos osteoblastos em todos os grupos experimentais com exceção do grupo tratado e analisado após 14 dias, uma vez que, nesse caso, a medula óssea já se mostrava permeando a maior parte da ferida deixando menos espaço disponível para o trabeculado ósseo.

Por sua vez, os osteoclastos mostraram-se mais presentes no grupo tratado na fase inicial da reparação, diminuindo com o passar de mais uma semana. Apesar de haver diminuição nesse caso, a presença de osteoclastos ainda era marcante. No grupo controle, esse quadro é inverso, sendo o número de osteoclastos menor no início da cicatrização e um pouco maior no final. Observar esquema Figura 5.5 e análise em HE figura 5.6.

5.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Os resultados das reações de imunoistoquímicas foram organizados sob forma de tabelas (tabelas 5.2 e 5.3) e sob forma de imagens (figuras 5.7 e 5.8) correlacionando o parâmetro previamente proposto (células ósseas, matriz e trabeculado ósseo) com a expressão imunoistoquímica dos marcadores utilizados. Estes resultados foram submetidos à estatística descritiva percentual de acordo com o que foi explicitado na seção de material e métodos. É imprescindível dizer que a análise em duplo cego mostrou concordância em todos os marcadores com exceção da osteopontina, mas somente para análise de osteoblastos e osteócitos. Então, para que esse resultado fosse analisado, um terceiro observador foi utilizado e o resultado discutido e apresentado é aquele que representa a concordância de 2 observadores.

Tabela 4.3 - Análise imunoistoquímica das proteínas Col I, ONC, OPN e BSP dos animais sacrificados aos 7 dias com e sem ozônio diluído em água MilliQ®

	Col I		ONC		OPN		BSP	
	7dias sem O ₃	7 dias com O ₃	7dias sem O ₃	7 dias com O ₃	7dias sem O ₃	7 dias com O ₃	7dias sem O ₃	7 dias com O ₃
Osteoblastos	+++	++	+++	+++	-	-	+++	++
Osteócitos	-	-	+++	+++	-	-	++	+++
Osteoclastos	+	+	-	-	-	-	+++	++
Matriz osteóide	Não	+++	Não	+	Não	++	Não	++
Trabéculas imaturas	+++	+++	+	+	++	++	+++	++

Tabela 4.4 - Análise imunoistoquímica das proteínas Col I, ONC, OPN e BSP dos animais sacrificados aos 14 dias com e sem ozônio diluído em água MilliQ®

	Col I		ONC		OPN		BSP	
	14dias sem O ₃	14dias com O ₃	14dias sem O ₃	14dias com O ₃	14dias sem O ₃	14 dias com O ₃	14 dias sem O ₃	14 dias com O ₃
Osteoblastos	++	+++	++	++	+++	-	+++	++
Osteócitos	-	-	+++	+	-	-	+++	++
Osteoclastos	+	+	-	-	-	-	+++	++
Matriz osteóide	Não	Não	não	Não	não	Não	Não	Não
Trabéculas imaturas	+++	+++	+	-	+++	++	++	++

Não – Parâmetro ausente no espécime analisado

5.2.1 Análise imunoistoquímica dos parâmetros utilizados

Nos osteoblastos, aos 7 dias de reparação observamos no grupo não tratado expressão mais intensa de Col I e que vai diminuindo ao chegar aos 14 dias de reparação, inversamente ao grupo que utilizou o ozônio. Ainda, os osteoblastos apresentaram em ambos os grupos de 7 dias, expressão intensa da ONC no início da reparação e que vai se tornando mais branda aos 14 dias. A OPN mostra-se negativa em ambos os grupos de 7 dias (tratado e não tratado) mas, ao chegar aos 14 dias de reparação somente o grupo não tratado passa a expressá-la com mais intensidade. Intensamente expressa também está a BSP nos osteoblastos do grupo de 7 dias não tratados e que se mantém neste patamar até os 14 dias de reparação. No grupo tratado a expressão da BSP nos osteoblastos é moderada e se mantém constante nesse patamar quando chega aos 14 dias de reparação.

Os osteócitos se encontram com expressão negativa para as proteínas Col I e OPN em todos os grupos estudados. A expressão da ONC em ambos os grupos de 7 dias foi intensa, entretanto, o nível de expressão permanece assim até os 14 dias apenas no grupo controle enquanto que no grupo tratado a expressão torna-se fraca. Curiosamente, o inverso de expressão ocorre com a BSP visto que se observa uma marcação moderada nos osteócitos no grupo controle que se torna intensa aos 14 dias, enquanto que no grupo tratado com ozônio, a expressão moderada aos 7 dias de reparação dá lugar a forte intensidade aos 14 dias.

Nos osteoclastos, a expressão do Col I é constante e fraca em todos os grupos. A ONC e a OPN estão negativas para este tipo de célula. No entanto, a BSP encontra-se intensa no grupo de 7 dias de reparação sem o ozônio e se mantém desta maneira até chegar aos 14 dias, diferentemente do grupo de 7 dias tratados que mantiveram até os 14 dias uma expressão moderada da BSP.

Interessantemente, a matriz osteóide só se encontrou presente aos 7 dias de acompanhamento e nos espécimes onde houve irrigação com ozônio diluído em água. Nesse único grupo experimental onde foi possível estudar a matrix osteóide, Col I mostrava expressão intensa, a OPN e BSP expressão moderada e a ONC expressão fraca.

Nas trabéculas imaturas, o Col I mostrou-se com expressão intensa no decorrer dos 14 dias de reparação em ambos os grupos (tratados e não tratados). A ONC expressou-se fracamente tanto nos grupos de 7 dias com e sem ozônio como aos 14 dias de reparação do grupo que não foi tratado. Já no grupo tratado, a expressão dessa proteína foi negativa. A BSP mostrou-se intensa no grupo controle de 7 dias e foi diminuindo ao chegar aos 14 dias de reparação, contrariando o grupo tratado com ozônio onde a expressão permaneceu moderada por todo o período de reparação.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para o estudo da correlação entre todos os marcadores e os parâmetros previamente estabelecidos. A análise mostrou que há diferença estatisticamente significativa $p=0,0044$ entre as médias dos marcadores utilizados OPN, ONC, BSP e Col I com os grupos dos animais avaliados.

Como essa avaliação é global e não há possibilidade da separação dos grupos comparando os diferentes tempos experimentais, foi realizado o teste de Mann-Whitney para a correlação entre cada marcador e seu respectivo grupo experimental ou controle (7 dias com e sem tratamento com ozônio e 14 dias com e sem tratamento com ozônio). Nessa análise, não foram encontrados índices estatisticamente significantes. Os resultados encontram-se explicitados na tabela 5.4.

Tabela 4.5 - Comparações individuais segundo os marcadores de grupos estudados pelo teste de Mann-Whitney

Variáveis comparadas	Nível de significância estatística segundo Teste de Mann- Whitney	
	7 dias com e sem Ozônio	14 dias com e sem Ozônio
ONC	p= 0,3770	p=0,1253
OPN	p=0,3008	p=0, 3008
BSP	p= 0,2654	p=0,1005
Col I	p=0,3381	p=0, 4173

Figura 5.1 - Análise em HE. (A-C): Imagens da ferida cirúrgica de 7 dias de reparação sem o uso de ozônio diluído em água MilliQ®. A: aumento 2,5x. Visão panorâmica mostrando a área da ferida exibindo a cortical inferior preservada. B: aumento 10x. Trabéculas ósseas imaturas no centro da lesão mostrando osteócitos viáveis no centro. C: aumento 40x. Detalhe das trabéculas imaturas com presença de osteoblastos nas margens e células da medula óssea permeando esse tecido (D-F): Imagens da ferida cirúrgica de 7 dias de reparação com o uso de ozônio diluído em água MilliQ®. D: aumento 2,5x. Visão panorâmica mostrando área central com expressiva celularidade e trabéculas ósseas nas áreas laterais E: aumento 10x. Área lateral da ferida exibindo trabéculas ósseas imaturas com áreas preenchidas pela medula óssea. F: aumento 40x. Área central da ferida exibindo celularidade intensa, numerosos osteoblastos, células do processo inflamatório, presença de matriz osteóide e hemorragia difusa. (G-I): Imagens da ferida cirúrgica de 14 dias de reparação sem o uso de ozônio diluído em água MilliQ®. G: aumento 2,5x. Visão panorâmica da ferida cirúrgica apresentando a porção inferior próximo à cortical óssea já remodelada e preenchida por células da medula óssea, substituindo as trabéculas ósseas que se encontram restritas à porção superior e em menor quantidade. H: aumento 10x. Detalhe da área trabeculada, mostrando as trabéculas mais maduras e com maior quantidade de células da medula óssea permeadas. I: aumento 40x. Detalhe das trabéculas ósseas com osteócitos aprisionados, presença de osteoclastos e osteoblastos e quantidade expressiva de células da medula óssea. (J-L): Imagens da ferida cirúrgica de 14 dias de reparação com uso de ozônio diluído em água MilliQ®. J: aumento 2,5x. Visão panorâmica da ferida cirúrgica exibindo trabéculas ósseas que ainda se estendem até a cortical inferior. K: aumento 10x. Trabéculas ósseas permeadas por grande quantidade de células da medula óssea. L: aumento 40x. Detalhe das trabéculas ósseas que são mais imaturas que as encontradas no grupo controle. É possível observar osteócitos aprisionados, osteoblastos e osteoclastos na margem das trabéculas ósseas, células da medula óssea e presença de hemácias por toda a região

Figura 5.2 - Representação esquemática da reparação óssea dos grupos de 7 e 14 dias tratados e controles. X: em cor branca: representação esquemática das trabéculas ósseas. Círculo: em cor vermelha: representação esquemática da medula óssea. A: esquema da ferida cirúrgica com 7 dias de reparação do grupo controle. Observa-se que as trabéculas ósseas encontram-se presentes no centro da lesão, em grande quantidade, porém ocupando toda a área da lesão inferior e superiormente de acordo com o esquema. A medula óssea representada encontra-se nas laterais da lesão sugerindo reparação das laterais para o centro (centrípeta). B: esquema da ferida cirúrgica com 14 dias de reparação do grupo controle. Observa-se que as trabéculas ósseas encontram-se em menor quantidade e com a medula óssea já ocupando a porção inferior da lesão, substituindo as trabéculas antes presentes. C: esquema da ferida cirúrgica com 7 dias de reparação do grupo tratado. Observa-se que a medula óssea encontra-se na periferia circundando as trabéculas ósseas representadas que estão nas regiões laterais da lesão, sugerindo reparação do centro para a periferia. D: esquema da ferida cirúrgica com 14 dias de reparação do grupo tratado mostra as trabéculas ósseas ainda em quantidade expressiva com poucas células da medula óssea substituindo-as na porção inferior da lesão representada no esquema

A7d s/ O₃ **B**14d s/ O₃ **C**7d c/ O₃ **D**14d c/ O₃

Figura 5.3- Imunoistoquímica das proteínas Col I, ONC, OPN e BSP nos grupos experimentais de 7 dias com e sem tratamento com ozônio. **Col I:** (A e B: 7 dias de reparação grupo controle). A: aumento 10x. Expressão intensa do Col I nas trabéculas ósseas. B: aumento 40x. Detalhe da expressão nos osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos apresentam-se negativos. (C e D: 7 dias de reparação grupo tratado). C: aumento 10x. Expressão moderada das trabéculas ósseas. D: aumento 40x. Osteoblastos presentes com expressão moderada, negativa para osteócitos e fraca para os osteoclastos. **ONC:** (E e F: 7 dias de reparação grupo controle). E: aumento 10x. Trabéculas ósseas com expressão fraca. F: aumento 40x. Osteoblastos e osteócitos com expressão intensa, negativa para os osteoclastos. (G e H: 7 dias de reparação grupo tratado). G: aumento 10x. Trabéculas ósseas com fraca expressividade. H: aumento 40x. Osteoblastos e osteócitos com expressividade intensa e negatividade para os osteoclastos. **OPN:** (I e J: 7 dias de reparação grupo controle). I: aumento 10x. Trabéculas ósseas com moderada expressividade. J: aumento 40x. Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos com expressividade negativa. (K e L: 7 dias de reparação grupo tratado). K: aumento 10x. Trabéculas ósseas com expressividade moderada. L: aumento 40x. Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos com expressividade negativa. **BSP:** (M e N: 7 dias de reparação grupo controle). M: aumento 10x. Trabéculas ósseas com intensa expressividade. N: 40x. Osteoblastos e osteoclastos com intensa expressividade. Osteócitos com moderada expressividade. (O e P: 7 dias de reparação grupo tratado). O: aumento 10x. Trabéculas ósseas com expressividade branda. P: aumento 40x. Osteoblastos e osteócitos com moderada expressividade já os osteócitos encontram-se com expressividade intensa

Figura 5.4 - Imunoistoquímica das proteínas Col I, ONC, OPN e BSP de 14 dias com e sem ozônio.

Col I: (A e B: 14 dias de reparação grupo controle). A: aumento 10x. Expressão intensa do Col I nas trabéculas ósseas. B: aumento 40x. Expressão branda dos osteoblastos e fraca para osteoclastos. Os osteócitos apresentam-se com expressão negativa. C e D: 14 dias de reparação grupo tratado. C: aumento 10x. Expressão intensa das trabéculas ósseas. D: aumento 40x. Osteoblastos presentes com expressão intensa, negativa para osteócitos e fraca para os osteoclastos. **ONC:** (E e F: 14 dias de reparação grupo controle). E: aumento 10x. Trabéculas ósseas com expressão fraca. F: aumento 40x. Osteócitos com expressão intensa, branda para osteoblastos e negativa para os osteoclastos. G e H: 14 dias de reparação grupo tratado. G: aumento 10x. Trabéculas ósseas com expressividade negativa. H: aumento 40x. Osteoblastos com expressão branda, osteócitos com expressividade fraca e negatividade para os osteoclastos. **OPN:** (I e J: 14 dias de reparação grupo controle). I: aumento 10x. Trabéculas ósseas com intensa expressividade. J: aumento 40x. Osteoblastos com expressividade intensa, osteócitos e osteoclastos com expressividade negativa. K e L: 14 dias de reparação grupo tratado. K: aumento 10x. Trabéculas ósseas com expressividade moderada. L: aumento 40x. Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos com expressividade negativa. **BSP:** (M e N: 14 dias de reparação grupo controle). M: aumento 10x. Trabéculas ósseas com moderada expressividade. N: 40x. Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos com intensa expressividade. O e P: 14 dias de reparação grupo tratado. O: aumento 10x. Trabéculas ósseas com expressividade moderada. P: aumento 40x. Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos com moderada expressividade

6 DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

A aplicação do ozônio é utilizada na Europa por vários pesquisadores da área da física durante os últimos 35 anos. Contudo, permaneceu ignorada pela medicina convencional, apesar da sua abordagem ser terapeuticamente muito útil em determinadas patologias (Bocci et al., 2009).

O trauma físico representa um dos desafios mais primitivos que ameaça a qualidade de vida do indivíduo. Reparar um problema requer ampla e compreensiva abordagem. Antes de tudo, o ambiente da lesão deve ser receptivo às terapias, depois, a terapêutica apropriada precisa ser identificada para manejar limitações sistêmicas que podem, secundariamente, prejudicar a resposta à reparação. Esse fator é centralmente importante ao fazer com que o microambiente da reparação seja receptivo à correção da hipóxia (Sen; Roy, 2008).

Recentes pesquisas identificaram que o oxigênio não é apenas requisitado como componente desinfetante nas lesões, mas também que o processo dependente-oxigênio redox representa o componente essencial na cascata da reparação (Bocci, 2004b; Bocci, 2006; Sen; Roy, 2008). Evidências suportam a idéia da importância de oxidantes como o H_2O_2 , que por sua vez, são mensageiros de sinalização da cascata de reparação. Não restando assim, dúvidas de que o estado redox modula a reparação tecidual (Sen; Roy, 2008; Bocci et al., 2009).

Com as pesquisas realizadas na reparação óssea, acreditamos que o ozônio diluído em água, foi capaz de interferir na cascata que sinaliza a reparação tecidual e na angiogênese. Fato esse observado aos 7 dias de reparação, onde o processo inflamatório mostrou-se com intensa celularidade na região central da lesão e onde foi notada quantidade expressiva de vasos neoformados, como está explicitado na tabela 5.1.

Pesquisas mostram que o ozônio, quando em contato com fluidos corporais, reage imediatamente com ácidos lipídicos poli-insaturados, antioxidantes como ácido

ascórbico, ácido úrico, componentes tiol com grupos –SH como a cisteína, glutamina reduzida e a albumina. Dependendo da dose utilizada do ozônio, carboidratos, enzimas, DNA e RNA também são afetados, provocando reações fisiológicas no local (Bocci, 2006). A exposição do tecido ao ozônio está associada com a ativação do fator de transcrição da via NFkappa β , que é um importante regulador da resposta inflamatória e eventualmente de todo o processo de reparação tecidual (Valacchi et al., 2005).

A quantidade maior de vasos neoformados pode ser explicada pelo fato de que o ozônio dissolve-se mais facilmente no plasma e, instantaneamente, reage com antioxidantes hidrossolúveis e com os ácidos lipídicos poliinsaturados disponíveis, levando à formação simultânea de 1 mol de H₂O₂ e 2 mols de (Pryor, 1994; Pryor et al., 1995). Esses produtos oxidativos lipídeos são responsáveis pela produção de vários compostos como o óxido nítrico que atua na angiogênese. (Bocci, 2004b; Bocci, 2006; Bocci, 2008).

Além disso, o ozônio provoca stress oxidativo agudo não deletério, que induz uma resposta celular antioxidante capaz de reverter o estresse oxidativo crônico existente. Em outras palavras, pode ajudar a normalizar o balanço redox alterado, que leva à uma melhora na circulação (vasodilatação local e angiogênese) (Bocci, 1996; Bocci, 2006).

Os resultados encontrados por Kim et al (2009), afirmam que o ozônio afeta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e Fator- α de Necrose Tumoral (TNF- α), as vias de respostas de inflamação como ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e ativação gênica de queratinócitos através da via NFkappa β . Seus estudos ainda afirmam que o ozônio atua na reparação tecidual aguda, diretamente ou indiretamente, via síntese de colágeno e da proliferação fibroblástica durante a formação de tecido de granulação. Os resultados de Kim e colaboradores mostraram que na fase inicial da remodelação tecidual, após 7 dias de reparação, houve aumento da intensidade de fibras colágenas e aumento significativo de fibroblastos no limite e no centro das lesões ozonizadas quando comparadas ao grupo controle do mesmo estudo. Com relação à presente pesquisa, quando comparamos o grupo de 7 dias com o grupo controle, observamos também a interessante presença de maior número de células e uma quantidade, também maior, de vasos neoformados, o que concorda com os autores supracitados. Aos

14 dias de reparação, os vasos neoformados no grupo tratado ainda superam a quantidade no grupo controle, o que nos leva a acreditar que realmente o ozônio atua no processo de angiogênese/vasculogênese, já que no grupo controle a quantidade de vasos neoformados continua constante durante toda a análise (7 e 14 dias).

A presença de osteoblastos no grupo controle, até 14 dias de reparação, continua intensa já no grupo que recebeu tratamento com ozônio, esta quantidade diminui de intensa para moderada. Isto pode ser explicado pelo fato de que o atraso na reparação óssea aos 7 dias pelo uso do ozônio, fez com que o grupo tratado quando comparado com o grupo controle ainda esteja na fase inicial da formação do calo ósseo. Assim, os osteoblastos, que tem a função de produção da matriz óssea, no grupo controle já estão no segundo estágio que é a formação do calo fibrocartilaginoso.

A quantidade de osteoclastos no grupo tratado mostrou-se maior na fase inicial da reparação, diminuindo com o passar de uma semana. Mesmo com essa diminuição, nesse caso, sua presença ainda era marcante. No grupo controle, esse quadro é inverso, sendo o número de osteoclastos menor no início da cicatrização e um pouco maior ao final. Isso nos leva a crer que como o ozônio aumenta o nível de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas do oxigênio (ROS), dependendo do tipo de célula, vias metabólicas diferentes são concomitantemente ativadas resultando em diferentes efeitos biológicos (Bocci et al., 2009). Nos neutrófilos e nos leucócitos, por exemplo, pode ativar e estimular a síntese de interleucinas e citocinas, favorecendo uma possível reativação fisiológica do sistema imunológico deprimido e nas plaquetas pode proporcionar o aumento de sua atividade e, como consequência, o aumento da liberação de autacóides e fatores de crescimento que pode contribuir para a reparação de tecidos (Bocci, 2004b; Bocci, 2006). No grupo tratado acreditamos que essa liberação de substâncias possa ter influenciado no aumento do número de osteoclastos, maior no grupo de 7 dias. Essas células são derivadas dos monócitos/macrófagos e sua função além de remodelação é a de limpeza da ferida através da reabsorção óssea o que pode explicar sua quantidade maior neste grupo.

Com relação às trabéculas imaturas, tanto os casos tratados quanto os não tratados, não mostraram trabéculas maduras nos 7 primeiros dias de avaliação. No

grupo tratado com ozônio, a região central da lesão era composta unicamente por células, enquanto o grupo sem tratamento já apresentava presença de trabéculas ósseas nessa região. As trabéculas imaturas eram, evidentemente, presentes nesse período de avaliação, mas é imperioso salientar que no grupo tratado, essas trabéculas localizavam-se somente nas áreas laterais da ferida cirúrgica em contato com a medula óssea, enquanto que no grupo controle, essas trabéculas já preenchiam a totalidade da ferida. Segundo Buliés (1996), o ozônio seria responsável pela resposta antiinflamatória no processo reparativo, entretanto, nossos resultados mostram o inverso e corroboram com Bocci et al (2006) e Cardoso (2000) que mencionam o ozônio como agente modulador do processo inflamatório.

Assim, de acordo com as considerações citadas nos parágrafos anteriores, nossos resultados mostram que houve um retardo generalizado na reparação óssea. É imperioso salientar que não há na literatura atual dados referentes da atuação do ozônio no tecido ósseo, sendo este estudo, portanto, pioneiro nessa área.

Ainda nesse sentido, foi observado nos dois grupos de 7 e 14 dias que nos animais que foram irrigados com o ozônio diluído em água, cujo frasco de vidro foi mantido sob refrigeração, não houve mudança alguma no processo de reparação óssea, e os resultados obtidos foram iguais aos grupos em que água MilliQ® foi utilizada. Sabemos que o ozônio atua na oxigenação do tecido e aumenta o número de vasos sanguíneos (Bocci, 2002; Nogales et al., 2008; Bocci et al., 2009; Andreula et al., 2003). Provavelmente a água ozonizada sob refrigeração inibiu o efeito do ozônio, anulando seus efeitos como agente modulador da inflamação através da contração dos vasos sanguíneos existentes devido à baixa temperatura.

6.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Com relação às análises imunoistoquímicas, através do teste de Kruskal-Wallis constatamos que houve uma diferença estatisticamente significativa em todos os grupos estudados ($p=0,004$). No entanto, quando avaliamos cada marcador com

seus respectivos grupos (através do teste de Mann-Whitney) com ozônio e sem ozônio, não observamos nenhuma diferença estatisticamente relevante.

Consideramos aqui apenas didaticamente a análise das proteínas segundo uma ordem de expressão seguindo as fases de reparação óssea, uma vez que todas as fases, segundo Schindeler et al (2008) acontecem simultaneamente.

Constatamos com a discussão da análise histomorfológica que o ozônio retarda a reparação tecidual e promove um tempo maior do estágio inicial da inflamação na forma do calo ósseo.

O Col I é o marcador que se expressa no início da reparação óssea, pois é encontrado na matriz celular e regula inúmeros processos celulares como migração, proliferação e diferenciação (Hagios et al., 1998; Lukashev; Werb, 1998). A expressão intensa do Col I mostrou que a reparação do grupo que utilizou o ozônio encontra-se realmente em fase precoce da reparação quando comparada com o grupo controle.

Observamos que nos osteoblastos, aos 7 dias de reparação o grupo não tratado mostrou expressão mais intensa de Col I e que vai diminuindo ao chegar aos 14 dias de reparação, inversamente ao grupo que utilizou o ozônio. Os osteoblastos produzem matriz não orgânica além de estarem associados à calcificação da matriz (Klein et al., 2003), A expressão mais acentuada no grupo de 14 dias com ozônio mostrou uma fase ainda de produção de Col I.

Entretanto, a produção de colágeno e proteínas não colágenas nem sempre são sincronizadas. A quantidade dessas proteínas geralmente está relacionada ao tipo de osso, a velocidade de formação do tecido e à densidade das fibras colágenas. Dessa forma a produção da síntese dos produtos colágenos e não colágenos pode ser modulada durante a formação do tecido ósseo (Nanci, 1999).

Os osteócitos mostraram-se com expressão negativa em todos os grupos analisados. O Col I no tecido ósseo e na dentina dá início ou inibe por completo a deposição de hidroxiapatita, através de um mecanismo complexo que envolve proteínas ácidas presentes na matriz extracelular (Calvert, 1994). Embora o colágeno tipo I esteja distribuído em todo o organismo, sua mineralização, comum no tecido ósseo e nos dentes, só ocorre em outros tecidos em condições patológicas como em calcificações de válvulas cardíacas (Gundberg, 2003). Assim, os osteócitos

negativos vistos nesse estudo não expressam mais tal proteína, uma vez que a matriz orgânica já foi depositada,

Os osteoclastos expressam o Col I fracamente em todos os grupos e, portanto, podemos afirmar, comparativamente, que o ozônio não interferiu na expressão do Col I nos osteoclastos.

Entre os grupos de 7 dias, interessante, no grupo sem ozônio já não mais observamos a presença de matriz osteóide na lesão, ao contrário do grupo de 7 dias onde foi utilizado ozônio diluído em água, além da sua presença, a expressão do Col I está fortemente positiva, o que indica novamente que o processo de maturação óssea encontra-se em algumas regiões na sua fase inicial, o que é confirmado pela análise histológicas.

O Col I mostrou-se fortemente expresso nas trabéculas imaturas em todos os grupos, o que indica que a mineralização aos 14 dias ainda encontrava-se em processo de reparação óssea ainda por finalizar a fase de remodelação.

As proteínas não colágenas que estudamos representam cerca de 10% da matriz orgânica dos tecidos mineralizados (Nefussi et al., 1997). Acredita-se que sejam as principais responsáveis pelas propriedades exclusivas que distinguem os vários tecidos mineralizados entre si. Seus padrões de expressão sugerem papéis biológicos diferentes dependendo do tempo e do local de expressão (Sommer; al, 1996).

A ONC está associada com a formação da matriz óssea. Ela está presente no controle da mineralização do osso, sendo expressa depois da deposição dos cristais de hidroxiapatita (Sommer; al, 1996; Boskey et al., 1998). A ONC regula a proliferação celular, estimula a angiogênese e a produção de metaloproteinases (Gundberg, 2003). A ONC é encontrada em osteoblastos, matriz osteóide, e osteócitos e cementoblastos bem como no osso, dentina e cimento (Sommer; al, 1996).

Nos osteoblastos, a expressão em ambos os grupos de 7 dias foi de forte intensidade seguida igualmente como marcação moderada nos 14 dias. Em ambos os casos, observou-se que não houve a deficiência de ONC no grupo em que foi utilizado o ozônio já que está semelhante ao grupo controle. Na avaliação de Sommer et al (1996), no desenvolvimento do metatarso de ratos, a ONC foi detectada após 16 dias do período embrionário com forte marcação nos

osteoblastos, controlando dessa maneira, a proliferação da linhagem osteoblástica (Sommer; al, 1996).

Na matriz osteóide sua presença foi verificada no grupo de 7 dias onde foi utilizado o ozônio diluído em água. Isso acontece já que a reparação óssea encontrou-se retardada neste grupo, e sua presença ainda é marcante. Nos osteócitos, no grupo de 7 dias, a expressão é a mesma dos osteoblastos, ou seja, intensa.

Aos 14 dias, no grupo tratado, a ONC mostrou-se branda nos osteócitos. Embora essa proteína apareça em maior concentração no osso, não é uma proteína específica do osso, podendo ser encontrada em outros locais como plaquetas, células endoteliais, fibroblastos do ligamento periodontal, macrófagos, membrana basal de neoplasias, glândula adrenal, gônadas, rim, brônquios, pele, megacariócitos, intestino, medula óssea, tendão, mesentério, artéria, cristalino, fígado e córnea (Sommer; al, 1996).

Esta proteína não é expressa pelos osteoclastos, o que é confirmado, uma vez que, nos grupos controle e tratado (tanto de 7 como de 14 dias) sua expressão foi negativa.

As trabéculas imaturas mostraram marcação branda para todos os grupos exceto no grupo onde foi utilizado ozônio diluído em água aos 14 dias de reparação. É possível que a negatividade da ONC neste grupo esteja relacionada com interações moleculares que o ozônio provoca durante as fases iniciais da reparação. É necessário que haja novas pesquisas para avaliar a atuação dessa proteína nas trabéculas imaturas quando aplicado o ozônio como alternativa terapêutica.

A expressão da OPN é elevada em resposta às citocinas pró-inflamatórias e à fadiga mecânica do osso (Denhardt et al., 2001). Devido à expressão da OPN ser induzida por várias citocinas inflamatórias e ser produzida por macrófagos em resposta ao estímulo inflamatório, acredita-se que a OPN possa estar envolvida na osteólise (Asou et al., 2001). Além disso, a OPN é quimiotática para vários tipos celulares, notavelmente monócitos/macrófagos que são atraídos para sítios de infecção e inflamação. É essencial para mediar a atuação do sistema imunológico e pela formação da Th1, uma citocina que atua durante a formação do granuloma (Denhardt et al., 2001; Sodek et al., 2000).

A OPN possui atividade em uma variedade de tecidos, incluindo osso, rins além do sistema imune e vascular. No osso, esta proteína atua dentro da matriz extracelular para promover a união do osteoclasto às superfícies mineralizadas, além de atuar como fator solúvel para ativar vias de sinalização intracelular (Denhardt et al., 2001). A OPN influencia a homeostase do osso, tanto inibindo a deposição de minerais como promovendo a diferenciação dos osteoclastos e sua atividade (Monfoulet et al., 2009) (Standal et al., 2004).

Nos grupos de 7 dias, tratados e controles, houve semelhança na expressão da OPN, sendo a expressividade sempre negativa para osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (ao contrário do que pressupõe a literatura), mas positiva no trabeculado ósseo (mostrando então que houve controle interno da reação). A literatura também afirma que a inflamação eleva os níveis de OPN (Denhardt et al (2001)) e isso não foi constatado em nossos casos.

Aos 14 dias o grupo tratado ainda mostrou expressão negativa para a OPN, mas interessante, o grupo controle passa a expressar essa molécula. Isso nos leva a crer que nos casos estudados a OPN somente foi expressa nas células (osteoblastos) quando essas já estavam mais maduras e diferenciadas. Portanto, o fato do grupo tratado não apresentar marcação enquanto o controle apresenta, corrobora com nosso achado prévio de que há atraso na reparação causado pela administração do ozônio.

Como a matriz osteóide só aparece no grupo de espécimes de 7 dias onde houve a aplicação do ozônio diluído em água, este parâmetro tornou-se referência para avaliarmos o estágio de reparação óssea dos grupos estudados. Assim, nesse grupo a OPN mostrou-se com expressão moderada. Assim, a expressão de OPN na matriz do grupo tratado na primeira avaliação, é semelhante à expressão dessa molécula em ambos os grupos na avaliação inicial (7 dias) e no grupo tratado de 14 dias nas trabéculas ósseas, mostrando que essa molécula expressa-se transitoriamente durante as fases iniciais da reparação. Esses resultados em conjunto mostram mais uma vez o atraso na reparação óssea.

Nos osteoblastos do grupo controle de 7 dias, a expressão da BSP foi intensa, diferentemente da expressão do grupo tratado com o ozônio que se mostrou moderada, o inverso aconteceu com os osteócitos. Os osteoclastos com expressão intensa no grupo controle de 7 dias, mostrou a BSP com expressão moderada no

grupo tratado. Essa variação de intensidade, mostrou que no grupo controle de 7 dias, a atividade osteoblástica é mais intensa uma vez que BSP é um marcador específico para osteoblastos maduros (Shapiro et al., 1993; Monfoulet et al., 2009).

Segundo Chen et al (1991), a expressão do gene da BSP coincide com a formação inicial da matriz mineralizada tanto na ossificação intramembranosa como na endocondral. Nas trabéculas imaturas, a BSP mostrou-se moderada aos 14 dias do grupo controle bem como no grupo tratado. É possível que aos 14 dias, a reparação, encontrou-se em estágio semelhante e que o ozônio só interferiu no início do processo até os 7 dias e que adiante à reparação, equiparou-se em ambos os grupos.

A reparação do osso envolve diferentes processos de acordo com o tipo da lesão e da estabilidade mecânica desta lesão. A maioria dos casos clínicos envolve fraturas ósseas, o qual há uma interrupção da cortical e da medula óssea, gerando variáveis padrões de distração e instabilidade mecânica. Nesta instância, a reparação óssea envolve níveis de ossificação endocondral e a reparação da cortical óssea ocorre secundariamente, como complexo processo que envolve a participação de componentes celulares e inúmeras substâncias moleculares da medula óssea, do periósteo, do endósteo e dos tecidos circunvizinhos. Entretanto, seus papéis na remodelação óssea permanecem pouco pesquisados (Schindeler et al., 2008).

Diante de todos esses fatos, nossos resultados mostraram que o ozônio diluído em água (utilizado sob forma de irrigação trans-operatória em organismos saudáveis) interferiu na reparação tecidual principalmente nos seus estágios iniciais, porém sem diferença marcante no final do processo. Sem dúvida, análises bioquímicas devem ser realizadas para compreendermos melhor o porquê desse atraso na reparação.

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para verificação global entre os parâmetros utilizados com os grupos estudados e pode ser utilizado para variáveis quantitativas e qualitativas. Com este teste podemos confirmar os dados descritivos.

Na presente pesquisa, pelo fato da avaliação imunoistoquímica ser qualitativa, tentamos quantificar essas análises para melhor compreensão dos dados. Com isso, verificamos que para o teste de Kruskal-Wallis, o $p = 0,0044$, ou seja, entre todas as proteínas estudadas nos grupos avaliados, houve uma diferença estatisticamente significativa entre as expressões dos marcadores entre os grupos estudados. No entanto, essa análise é muito vaga e não sinaliza para o principal achado do nosso trabalho que é o atraso na reparação óssea nos grupos tratados.

O teste de Mann-Whitney fornece uma alternativa não paramétrica para avaliarmos resultados de estudos imunoistoquímicos (Rejas, 2008; Cortes, 2009). Assim, nas avaliações realizadas, observamos que quando comparamos cada anticorpo com os grupos experimentais (7 e 14 dias tratados e não tratados), os resultados são todos não significantes. Apesar de considerarmos a análise estatística uma opção complexa e por vezes inconsistente para a quantificação de dados qualitativos, a literatura mostra essa avaliação necessária (Rejas, 2008; Cortes, 2009). Nossos resultados dessa análise podem então ser interpretados unicamente como: se há um atraso, esse é estatisticamente insignificante.

Estes resultados nos mostram que o uso do ozônio apesar de ter ocasionado o atraso na reparação do osso, não causou diferenças relevantes durante e no final do processo. Com isso, devemos avaliar criteriosamente seu uso e novas pesquisas são necessárias para analisar o seu comportamento principalmente em patologias que possam estar associadas a distúrbios de vascularização e hipóxia tecidual.

7 CONCLUSÃO

Esta pesquisa permitiu concluir que o ozônio diluído em água utilizado como irrigação durante o trans-operatório de procedimentos cirúrgicos:

- Interferiu no processo de reparação óssea em especial nos estágios iniciais;
- Ocasionou atraso na reparação óssea demonstrado pela análise morfológica e pela análise da expressão das proteínas Col I, ONC, OPN e BSP.

REFERÊNCIAS¹

AbuNaba'a L, Shorman H Al, Holmes J, Peterson L, Tagami J, Lynch E. Evidence-based research into ozone treatment in dentistry: an overview. In: Lynch E, editor. Ozone: the revolution in dentistry. London: Quintessence Publishing Co; 2004. p. 73-115

Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti A. Ozone therapy in the treatment of avascular Bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. J Craniofac Surg. 2007;18(5):1071-5.

Andreula CF, Simonetti, De Santis F, Agati R, Ricci R, Leonardi M Minimally Invasive Oxygen-Ozone Therapy for Lumbar Disk Herniation. Am J Neuroradiol. 2003;24:996-1000.

Andreula CF, Simonetti L, Santis F De, Agati R, Ricci R, Leonardi M. Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation. Am J Neuroradiol. 2003;24:996-1000.

Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: Regulation and signaling leading to dysfunction. Exp Biol Med. 2006;231:237-51.

Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, Okinaga T, Masumi S, Morikawa M, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. Oral Microbiology & Immunology. 2005;20:206.

Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, Tsuji K, Shinomiya K, Nifuji A. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. Endocrinology 2001;142(3):1325-32.

Aubin JE, Grupta AK, Zirngub I, Rossant J. Knockout mice lacking bone sialoprotein expression have bone abnormalities. J Bone Miner Res. 1996;11:S102.

Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. J Dent. 2008;36:104-16.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells. Characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004;8:301-16.

Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*. 1999;14:1805-15.

Barnes PJ, FY Liew. Scientific rationale for inhaled combination therapy with long-acting beta-2-agonists and corticosteroids. *Immunol Today*. 2002;16:128-30.

Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today*. 1995;16:128-30.

Bastacky J, Lee CYC, Goerke J, Koushafar H, Yager D, Kenaga L, Speed TP, Chen Y, Clements JA. Alveolar lining layer is thin and continuous: Low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *J Appl Physiol*. 1995;79:1615-28.

Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent*. 2004;17(1):56-60.

Beck Gr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8352-7.

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine ID, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int*. 1991;49:421-6.

Biedunkiewicz B, Tylicki L, Niewegloski T, Burakoski S, Rutkowski B. Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study. *Int J Artif Organs*. 2004;27:29-34.

Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for the therapy oh Human Immunodeficiency Virus Infection and several other diseases. *Med Hypotheses* 1996;46:150-4.

Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci*. 1999;56:270-9.

Bocci V. Oxygen-ozone therapy. A critical evaluation. In: Dordrecht, editor. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2002. p. 440.

Bocci V. How Ozone acts and how it exerts therapeutic effects. In: E L, editor. United Kingdom: Quintessence Publishing Books; 2004b. p. 15-22.

Bocci V. Ozone. The Netherlands: Springer; 2005.

Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of art. Arch Med Res. 2006;37:425-35.

Bocci V. Why orthodox medicine has not yet taken advantage of ozone therapy. Arch Med Res. 2008;39:259-60.

Bocci V. Why orthodox medicine has not yet taken advantage of ozone therapy. Arch Med Res. 2008;39:259-60.

Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. Mediators of Inflammation. 2004a;13:3.

Bocci V, Bocelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. Med Res Rev. 2009;29(4):646-82.

Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Aldinucci C, Silvestri S, Paccagnini E, Gerli E. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. J Biol Regul Homeost Agents. 1998;12:67-75.

Bocci V, Valacchi G, Rossi R, Giustarini D, Paccagnini E, Pucci AM. Studies on the biological effects of ozone: 9. effects of ozone on human platelets. Platelets. 1999;10:110-6.

Boskey AL. Biomineralization. J Cell Biochem Suppl. 1998;30-31:83-91.

Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg S. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. Bone. 1998;23:187-96.

Buliés JCE. Una solución para exposiciones óseas postraumáticas: asociación de injerto de epiplon mayor con ozonoterapia. *Rev Cubana Invest Biomed.* 1996;15(2):1-9.

Burns DT. Early problems in the analysis and the determination of Ozone. *Fresenius J Anal Chem.* 1997;357:178-83.

Buser D. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Books; 1994. p. 265.

Calvert PD. Biomimetic mineralization: process and prospects. *Mat Sci Eng.* 1994;1(2):69-74.

Cardoso CC, Carvalho JCT, Ovando EC, Macedo SB, Dall'Aglio R, Ferreira LR. Action of ozonized water in preclinical inflammatory models. *Pharmacol Res.* 2000;42(1):51-4.

Celiberti P, Pazera P, A Lussi. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. *Am J Dent.* 2006;19:67-72.

Chen IK, Sasaguri K, Sodek I, Aufdemorte TB, Jiang A, Thomas HF. Enamel epithelium expresses bone sialoprotein (BSP). *Eur J Oral Sci* 1998;106:331-6.

Chen IK, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche IN, Sodek I. Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization Matrix. 1991;11:133-43.

Chen J, Shapiro HS, Sodek J. Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res.* 1992;7:987-97.

Clavo B, Perez JL, Lopez L, Suarez G, Loret M, Rodrigues V, al et. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. *J Altern Compl Med.* 2003;9:251-6.

Colnot C, Huang S, Helms J. Analysing the celular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;350:557-61.

Cortes ARG. Comparação imunoistoquímica das expressões p27 e c-jun na carcinogênese oral. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2009.

Cotran RS, Kumour V, Robbins SL. Inflammation and repair. In: Robbins, editor. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: WS Saunders; 1994. p. 351-92.

Cruz OG, Menendez SC, Jordan M, Vasquez T. Aplicacion de la ozoniterapia en el tratamientos de la alveolitos. Rev Cuba Estomato. 1997;34(1):21-4.

Denhardt DT, Noda M, O'Reagan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with enviromental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling and cell survival. J Clin Revest. 2001;107:1055-61.

Dudley M, Jonhson AL. Open reduction and bone plate estabilization, compared with closed reduction and external fixation for treatment of commuted tibial fractures: 47 cases (1980- 1995) in dogs. J Am Vet Med Association. 1997;211(8):1008-12.

Ebensberger U, Pohl Y, Filippi. PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. Dent Traumatol. 2002;18:262.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998;355:S7-21.

Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. Int Endod J. 2007;40:85-93.

Fan X, Biskobing DM, Fan D, Hofstetter W, Ruben J. Macrophage colony stimulating factor down-regulates MCSF- recetor expression and entry of progenitors into the osteoclast lineage. J Bone Miner Res. 1997;12:1387-95.

Fincham AG. The extracellular matrix of developing dental enamel. In: Perspectives in Differentiation and Hypertrophy. Anderson W, Sadler W, editor. New York 1982.

Fish E, inventor Apparatus for the production and use of ozone in therapeutics 1936.

Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem*. 1983;258:12723-7.

Fries RB, Wallace WA, Roy S, Kuppusamy P, Bergdall V, Gordillo GM, et al. Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res* 2005;579:172-81.

Ganss B, Kim R.H., Sodek J. Bone Sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* ; ;. 1999;10:79.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):79-81.

Gerstenfeld LV, Cullmann, Barnes GL, Einhorn TA. Fracture healing as a post natal development process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 2003;88:873-84.

Gonzalez R, Borrendo A, Zamora Z, Romay C, Hernandez F, Menendez S, et al. Reversion by ozone treatment of acute nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Med Inflamm*. 2004;13:307-12.

Gracer RI, Bocci V. Can the combination of localized "proliferative therapy" with "minor ozonated autohemotherapy" restore the natural healing process? *Med Hypotheses*. 2005; 65:752-9.

Grant DS, Kleinman HK. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS*. 1997;79:317-33.

Grootveld M, Baysan A, Sidüqui N, Sim J, Silwood C, Lynch E. History of the clinical applications of ozone. In: E L, editor. London: Quintessence Publishing CO; 2004. p. 23-30.

Guerra OC, Cepero CM, Jordán J, Vázquez TJ. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. *Rev Cuba Estomato*. 1997;34(1):21-4.

Gundberg CM. Matrix proteins. *Osteoporos Int*. 2003;14(5):S37-S42.

Hagios C, Lochter A, Bissel MJ. Tissue architecture: The ultimate regulator of epithelial function? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998; 353:857-70.

Halliwell B, Clemeney MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000;486:10-3.

Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2005;38:22.

Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology.* 2003;20:106-14.

Huth KC, Jakob S, Saugel B, Cappelo C, Paschos E, Hollweck R, al et. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:435-40.

Hutmacher DW, Sittering M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2003;9(suppl 1):545-64.

Iliakis E, Valadakis V, Vynios DH, Tisiganos CP, Agapitos E. Rationalization of the activity of medical ozone on intervertebral disc: a histological and biochemical study. *Riv Neuroradiol.* 2001;14(suppl 1):23-30.

Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem.* 2000;275:20197-203.

Kim HS, Noh S, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci.* 2009;24:368-74.

Klein P, Schell SH, Streitparth F, Heller M, Kassi JP, Kandziora F, al et. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res.* 2003;21:662-9.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, al et. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999;397:315-23.

Kühnel K, Seifert V. Erwin Payr and his contribution to neurosurgery. *Neurochir.* 1998;59:27-35.

Larini A Bocci V. Albumin is the most effective antioxidant during human plasma and blood ozonization. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia.* 2004;3:15-24.

Last JA Gohil K, Mathrani VC, Kenyon NJ. . Systemic responses to inhaled ozone in mice: Cachexia and down-regulation of liver xenobiotic metabolizing genes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;208:117-26.

Liaw L. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest.* 1998;101:1468-78.

Lim Y, Phung AD, Corbacho AM, Aung HH, Maioli E, Reznick AZ, Cross CE, Vallachi G. Modulation of cutaneous wound healing by ozone:differences between young and aged mice. *Toxicol Lett.* 2006;160:127-34.

Lipsky BA. Medical treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis.* 2004;39:S104-S14.

Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: Orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 1998;8:437-41.

MacNeil RL, Berry I, D'Errico I, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman MI. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res.* 1995;33:1-7.

MacNeil RL, Berry J, Strayhorn C, Somerman MI. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Arch Oral Biol.* 1996; 41:827-35.

Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: Phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol.* 1983;97:153-65.

Malizos KN, Papatheodore LK. The healing potential of the periosteum. Molecular aspects. *Injury.* 2005;36(suppl 3):S13-9.

Mirabelli F, Salis A, Bellomo G, al et. Surface blebbing and cytoskeletal abnormalities caused by sulphhydryl reagents in isolated hepatocytes, II: oxidizing reagents. . Med Biol Environ 1988;16:201-11.

Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling S, Gadeau A, Fricain CGC, Chassande O. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. Bone. 2009;1-6.

Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. European Journal of Oral Sciences. 2007;115:77-80.

Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. European Journal of Oral Sciences. 2007;115:77-80.

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita N Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. J Endod. 2004;30:778.

Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. J Struct Biol. 1999;126(3):256-69.

Nefussi JR, Bami G, Modrowski D, Oboeuf M, Foust N. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation on bone nodule formation in vitro. J Histochem Cytochem. 1997;45(4):493-503.

Nogales CG, Ferrari PH, Kantovovich EO. Ozone therapy in Medicine and Dentistry. J Contemp Dent Pract. 2008;9(4):1-9.

O'Regan A , Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cellmediated and granulomatous inflammation. Int J Exp Pathol. 2000;81:373-90.

Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. J Periodont Res. 2008;43:127-35.

Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE, Gelb LD, al et. A vaccine to prevent herpes zoster nd postherpetic neuralgia in older adults. N Engl J Med. 2005;351:2805-16.

Pae HO, Chung HT. Heme Oxygenase-1: Its Therapeutic Roles in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* 2009;9(1):12-9.

Park YK, Yang MH, Park HR. The impact of osteonectin for diferential diagnosis of osteogenic bone tumours. In *skeletal radiol.* 1996;25(1):13-7.

Pryor WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Rad Brd Med.* 1994;17:451-65.

Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Rad Biol Med.* 1995;19:935-41.

Quinn JM, Gisleespie MT. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328:739-45.

Ranieri A, Petacco F, Castagna A, GF Soldatini. Redox state and peroxidase system in sunflower plants exposed to ozone. *Plant Sci.* 2001;159:159-67.

Rejas RAG. Estudo da imunoexpressão das proteínas C-JUN e JUNB em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares. São Paulo: Faculdade de Odontologia 2008.

Rittling SR, Matsumoto HN, Mckee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure by display altered osteoclast formation. *J Bone Miner Res.* 1998;13:1101-11.

Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int.* 1994;18:617-28.

Robey PG, Boskey AL. Mineral and Matrix. Ifeldman D, Jowsey J, editors. San Diego: Academic Press; 1996.

Ruben MB. The history of ozone: The Schönbein period. *Bill Hist Chem.* 2001;26:40-56.

Rumi MN, Deol GS, Sinagpuri KP, Pellegrini HJ. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res*. 2005;23:34-40.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2008;19:459-66.

Seidler V, Linetskiy I, Hubálhová H, Stanková H, Smucler R, Mazánek J. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. *Prague medical report*. 2008;109(1):5-13.

Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(1):1348-61.

Shapiro HS, Chen I, Wrana JL, Zhang O, Blum M, Sodek J. Characterization of porcine bone sialoprotein: primary structure and cellular expression. *Matrix*. 1993;13:431-40.

Shen ZX, Heinegard D, Sommarin Y. Distribution and expression of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein show marked changes during rat femoral-head development. *Matrix Biol*. 1995;14:773-81.

Silva S. Mineralização biomimética in vivo e in vitro de matrizes de colágeno aniônico: modelo de biomineralização. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.

Ozone: molecule with a split personality [database on the Internet]2001

Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11:279-303.

Sommer B, et al. Expression of matrix proteins. *Bone*. 1996;19(4):371-80.

Stamler JS. S-nitrosothiols in the blood: roles, amounts and method of analysis. *Circ Res*. 2004;94:414-7.

Standal T, Borset M, Sundam A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Expo Oncol*. 2004;26(3):179-84.

Steinhart H, Schulz S, Mutters R. Evaluation of ozonated oxygen in an experimental animal model of osteomyelitis as a further treatment option for skull-base osteomyelitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1999;256:153-7.

Stenner DD, Tracy RP, Riggs BL, Riggs KG, Mann KG. Human platelets contain and secrete osteonectin, a major protein of mineralized bone. *Proc natl acad sci USA*. 1986;83:6892-6.

Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:243-70.

Stübinger S, Saber R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int*. 2006; 37(50):353-9.

Sunnen GV. The utilization of ozone for external Medical Applications. *Ozonics International*. 2005.

Suzuki T, Oizumi M, Furuya J, Okamoto Y, Rosenstiel SF. Influence of ozone on oxidation of dental alloys. *Int J Prosthodont*. 1999;12:179-83.

Sweeney SM, Guy CA, Fields GB, San Antonio JD. Defining the domains of type I collagen involved in heparin-binding and endothelial tube formation. *Proc natl acad sci USA*. 1998; 95:7275-80.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289:1504-8.

Timbrel J. The poison paradox: Chemicals as friends and foes. Oxford: Oxford University Press. 2005:352.

Traina AP. Efeitos biológicos da água ozonizada na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos. São Paulo: Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo-FOUSP; 2008.

Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediat Inflamm*. 2000;9:271-6.

Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol*. 2005;153:1096-100.

Valacchi G, Vliet A, Schock BC, Okamoto T, Obermuller-Jevic U, Cross CE, al et. Ozone exposure activates oxidative stress responses in murine skin. *Toxicol.* 2002;179:163-70.

Viebahn R. The Use of Ozone in Medicine. F. HK, editor: Haug Publisher; 1994.

Vincent F. Mechanisms of cutaneous wound repair. McGraw H, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editor. New York: Fitzpatrick's dermatology in general medicine; 2003.

Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:3327.

Waltregny D, Bellahcène A, Riet IV, Fisher LW, Young M, Fernandez P, Dewé W, al et. Prognostic vlue of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostrate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:100-8.

Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochem Biophys Acta.* 2001;1552:61-85.

Wentworth Jr P Wentworth , Zhu X, Wilson IA, Janda HD, Eschenmoser A, Lerner RA. Evidence for the production of trioxxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(1490-1493).

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 22/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa-Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, APROVOU o protocolo de pesquisa: **"Estudo do efeito do ozônio diluído em água na reparação óssea através de avaliação imunoistoquímica"**, de responsabilidade do Pesquisador: **Juliana Noguti, sob orientação do Professor Doutor Andrea Mantesso.**

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01 (um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 01 de outubro de 2009.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUB-COMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP