ALEXANDRE VIANA MONTEIRO FRASCINO

**Efeitos do ozônio diluído em água no reparo de feridas monocorticais em
fêmures de ratos Wistar induzidos ou não ao diabetes: estudo
histomorfológico e histomorfométrico
(VERSÃO CORRIGIDA)**

São Paulo

2011

ALEXANDRE VIANA MONTEIRO FRASCINO

**Efeitos do ozônio diluído em água no reparo de feridas monocorticais em
fêmures de ratos Wistar induzidos ou não ao diabetes: estudo
histomorfológico e histomorfométrico**

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

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Faciais

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

São Paulo

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

Frascino AVM. Efeitos do ozônio diluído em água no reparo de feridas monocorticais em fêmures de ratos Wistar induzidos ou não ao diabetes: estudo histomorfológico e histomorfométrico. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: 11 / 04 / 2011

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Reinaldo, exemplo de dedicação e coragem; à minha mãe Silvana, sinônimo de força, garra e carinho juntos; ao meu irmão Fernando, companheiro incondicional em todos os momentos. Aos meus avós, Eda e Geraldo, por tudo; aos meus primos Renato e Miúcha; Carla e José Augusto, meus melhores amigos e aos meus tios Flávio e Eliana, cientistas de primeira linha.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni, que se dedicou a me guiar desde os primeiros passos na carreira acadêmica, mostrando o verdadeiro sentido da palavra: Professor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que participaram de forma a acrescentar valores para a realização deste trabalho. Aos meus colegas da Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, Gabriel Campolongo, Leandro Hanna, Maria Del Pilar, Mariana Brozski, Ophir Ribeiro Jr., Rodrigo Foronda e Samantha Cavalcanti pelo companheirismo, pela colaboração e pelos ensinamentos. À mestra em patologia bucal Juliana Noguti pelo coleguismo nas fases iniciais da realização desta pesquisa. Às técnicas de laboratório e clínica, Cida e Natália; secretários Rose, Ângela, Belira e Edson e à técnica do laboratório de Patologia Bucal, Elisa. Aos alunos da graduação que foram capazes de engrandecer meu convívio acadêmico e pela oportunidade de, com eles, poder ensinar e aprender.

Agradeço a todo o corpo docente da Disciplina de Cirurgia da FOUSP, em especial Profa. Dra. Maria da Graça Naclério Homem e Dra. Vera, pela oportunidade de participar de uma grandiosa equipe. Às professoras Dra. Andrea Mantesso, Dra. Luciana Corrêa e Dra. Andrea Traina, pelas preciosas colaborações e co-orientações. A CAPES – Coordenação de Aprimoramento de Pessoal em Nível Superior pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todas as pessoas que sempre me incentivaram acreditar que é possível fazer melhor a cada dia, que é importante cair e levantar quantas vezes forem necessárias e a jamais desistir.

RESUMO

Frascino AVM. Efeitos do ozônio diluído em água no reparo de feridas monocorticais em fêmures de ratos Wistar induzidos ou não ao diabetes: estudo histomorfológico e histomorfométrico [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Alguns relatos encontrados na literatura sobre as propriedades da molécula de ozônio de interferir de maneira favorável na reparação de tecidos e da sua ação antimicrobiana têm fundamentado emprego do ozônio com fins terapêuticos no tratamento de diversas doenças. Nenhuma pesquisa ainda conseguiu comprovar, por meio de estudos padronizados, os efeitos terapêuticos sobre os processos de reparação óssea desta molécula triatômica de oxigênio quando diluído em água. Nesta investigação foram avaliados os aspectos histomorfológicos e histomorfométricos do processo de reparo tecidual ósseo após a irrigação com 100mL de 4ppm de ozônio diluído em água Milli-Q[®] durante a perfuração de feridas monocorticais padronizadas, realizadas por meio de broca trefina (2mm), após 7, 14 e 21 dias, em fêmures de ratos Wistar induzidos e não induzidos ao diabetes por injeção intraperitoneal de Estreptozotocina (STZ- Sigma[®]). Nos grupos controles as feridas foram irrigadas com de 100mL de água Milli-Q[®] pura. Os resultados histomorfológicos revelaram que os animais diabéticos que receberam o ozônio apresentaram intensa hemorragia, maior proliferação de vasos sanguíneos e trabeculado ósseo imaturo quando comparados aos animais diabéticos não submetidos à aplicação de ozônio em todos os períodos avaliados. Os animais não diabéticos que receberam ozônio apresentaram intenso infiltrado inflamatório e maior proliferação de vasos sanguíneos quando comparados aos animais do grupo controle. Comparativamente as feridas nos animais que receberam a irrigação por meio de água ozonizada mostraram maior proliferação de vasos sanguíneos e trabéculas ósseas mais imaturas quando comparados aos animais dos grupos que não receberam ozônio. A avaliação histomorfométrica mostrou as médias percentuais de trabéculas ósseas neoformadas. O estudo estatístico, entre os grupos de animais diabéticos e não diabéticos, não apresentou resultados estatisticamente significantes (7 dias, $P=0,362$; 14 dias, $P=0,54$; 21 dias, $P=0,351$)

nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. A comparação entre o grupo de animais não diabéticos que receberam e não receberam o ozônio, 21 dias pós-operatórios mostrou resultados estatisticamente significantes ($P=0,034$) confirmando um retardo no processo de maturação das trabéculas. Os resultados desta pesquisa sugerem que a irrigação de feridas ósseas de animais induzidos e não induzidos ao diabetes empregando solução de 4ppm de ozônio diluídos em água Milli-Q® foram capazes de estimular a proliferação de vasos sanguíneos durante a fase inflamatória da reparação tecidual, sem produzir efeitos tóxicos ou prejudiciais, mas não mostrou benefícios na neoformação de trabéculas ósseas em animais diabéticos.

Palavras-chave: Ozônio. Reparação óssea. Diabetes. Reparação tecidual.

ABSTRACT

Frascino AVM. Aqueous ozone solution irrigations on bone monocortical wound healing in femurs of Wistar rats induced or not to diabetes: histomorphological and histomorphometric study [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Some accounts in the medical literature about ozone's molecule properties to favorably interfere with tissue repair and its antimicrobial action have based the therapeutic usage of ozone to treat several diseases. No standardized investigation yet succeeded to establish the therapeutic effects over bone repair process of this triatomic molecule of the oxygen when diluted in pure water. In this investigation we evaluated the histomorphological aspects of bone tissue repair process after irrigation with 100 ml of the 4 ppm of the ozone dissolved in Milli-Q[®] during drilling of the standardized monocortical wounds performed through trephine drill (2mm), after 7, 14 and 21 days in femurs of rats induced and not induced to diabetes by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, Sigma[®]). The wounds of the control groups were irrigated with 100ml of Milli-Q[®]. The histomorphological evaluation revealed that the diabetic animals that received ozone showed intense hemorrhage, increased proliferation of blood vessels and immature bone trabeculae when compared with diabetic animals not submitted to the application of ozone in all evaluated periods. The non-diabetic animals that received ozone presented intense inflammatory infiltrate and increased proliferation of blood vessels compared to the control group. Comparatively wounds of the animals that received irrigation through ozonized water showed higher proliferation of blood vessels and bone trabeculae more immature when compared to groups that did not receive ozone. Histomorphometric of bone trabeculae development, comparatively in wounds of diabetic and non diabetic animals showed no statistically significant results (7 days, $P=0,362$; 14 days, $P=0,54$; 21 days, $P=0,351$). The comparison of bone trabeculae development between wounds in the group of non-diabetic animals that received and did not receive ozone, 21 days postoperatively showed statistically significant ($P = 0.034$). These results suggests that the irrigation of bone wounds of animals induced

and not induced to diabetes with 4 ppm of ozone diluted in Milli-Q[®] were capable to stimulate the proliferation of blood vessels during the inflammatory phase of tissue repair without producing toxic or detrimental effects but did not improve bone trabeculae development when a diabetes state is present.

Keywords: Ozone. Bone healing. Diabetes. Tissue repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Exposição do fêmur.....	37
Figura 4.2 - Perfuração óssea monocortical.....	37
Figura 4.3 - Esquema apresentando a distribuição, dentro da ferida óssea, dos campos analisados pela histomorfometria	40
Figura 5.1 - Fotomicrografias das feridas ósseas, de cada grupo e período (HE - aumento 250x)	46
Figura 5.2 - Fotomicrografias das feridas ósseas, de cada grupo e período (HE - aumento 400x).	47
Gráfico 5.1 - Representação gráfica das médias de porcentagem de osso neoformado	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Distribuição dos animais dentro dos grupos controle e experimentais.	34
Tabela 5.1 - Resultado da avaliação histomorfológica quantitativa arbitrária dos cortes histológicos nos grupos e períodos	45
Tabela 5.2 - Médias da porcentagem de trabéculas ósseas formadas em cada grupo e período.	48
Tabela 5.3 - Resultado do teste de uniformidade de Kolmogórov-Smírnov para as leituras obtidas pela histomorfometria.....	50
Tabela 5.4 - Resultados do teste de Mann-Whitney para as diferenças entre as médias dos subgrupos (N H ₂ O+O ₃) e (N H ₂ O) quanto aos períodos de observação de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios.....	51
Tabela 5.5 - Resultados do teste de Mann-Whitney para as diferenças entre as médias dos subgrupos (D H ₂ O+O ₃) e (D H ₂ O) quanto aos períodos de observação de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios	52
Tabela 5.6 - Resultados do teste de Mann-Whitney para as diferenças entre as médias dos subgrupos (D H ₂ O+O ₃) + (N H ₂ O+O ₃) e os subgrupos (D H ₂ O) + (N H ₂ O) quanto aos períodos de observação de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios	52
Tabela 5.7 - Resultados do teste de Kruskal-Wallis entre os grupos D H ₂ O+O ₃ ; D H ₂ O; N H ₂ O+O ₃ e N H ₂ O quanto aos períodos de observação de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos finais avançados da glicosilação (<i>advanced glycation end-products</i>)
ATP	Adenosina tri-fosfato
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Gás Carbônico
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
COX-2	Enzima ciclo-oxigenase-2
D H ₂ O+O ₃	Grupo de animais induzidos ao diabetes que recebeu irrigação por meio de água ozonizada
D H ₂ O	Grupo de animais induzidos ao diabetes que recebeu irrigação por meio de água pura
D	Grupo de animais induzidos ao diabetes
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBP	via da hexosamina (<i>hexosamine biosynthesis pathway</i>)
HE	Hematoxilina Eosina
HFI	Fatores de transcrição indutíveis por hipoxia
IL-1	Interleucina-1
IPEN	Instituto de Pesquisas Nucleares
LIDO	Laboratório de Informática dedicado a Odontologia
N H ₂ O+O ₃	Grupo de animais não induzidos ao diabetes que recebeu irrigação por meio de água ozonizada
N H ₂ O	Grupo de animais não induzidos ao diabetes que recebeu irrigação por meio de água pura

N	Grupo de animais não induzidos ao diabetes
NAD	Nicotinamida difosfato
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PKC	Proteína C quinase (<i>protein kinase C</i>)
POLs	Ácidos lipídicos poli-insaturados
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo
RAGEs	Receptores dos produtos finais avançados da glicosilação
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SPSS	Statistical package for social sciences (software para análise estatística)
STZ	Estreptozotocina (<i>Streptozotocin</i> - Sigma [®])
TNF-α	Fator-α de Necrose Tumoral
TRAP	Fosfatase ácido tártaro resistente
UI	Unidades Internacionais

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	Mililitros ($1\text{L} \times 10^{-3}$)
ppm	Partes por Milhão (mg / L)
pH	Potencial Hidrogeniônica
μg	Micrograma ($1\text{g} \times 10^{-6}$)
m	Metro
Kg	Kilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mm	Milímetro
%	Por cento
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
x	Vezez

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISTA DA LITERATURA	19
2.1 REPARAÇÃO DOS TECIDOS ÓSSEOS	19
2.2 DIABETES MELLITUS	21
2.3 DIABETES MELLITUS E REPARAÇÃO ÓSSEA	25
2.4 APLICAÇÃO DO OZÔNIO E A REPARAÇÃO TECIDUAL	26
2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DO DIABETES MELLITUS	30
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAL	33
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Indução ao Diabetes	34
4.2.2 Produção da Água Ozonizada	35
4.2.3 Procedimentos Cirúrgicos	35
4.2.4 Eutanásia dos Animais	38
4.2.5 Preparação das Amostras Histológicas	38
4.2.6 Análise Histomorfológica	39
4.2.7 Análise Histomorfométrica	39
4.2.8 Análise Estatística	40
4.2.8.1 Análise Estatística de Uniformidade dos Grupos Experimentais	40
4.2.8.2 Análise Estatística das Variáveis de Interesse	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Análise Histomorfológica	42
5.1.1 Período de Sete (7) Dias Pós-Operatórios	42
5.1.2 Período de Quatorze (14) Dias Pós-Operatórios	43
5.1.3 Período de Vinte E Um (21) Dias Pós-Operatórios	44
5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	48
5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5.3.1 Análise Estatística de Uniformidade dos Grupos Experimentais	49
5.3.2 Análise Estatística das Variáveis de Interesse	50

6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

A reparação dos tecidos é uma complexa sequência de eventos moleculares e celulares que atuam de forma coordenada para restaurar as estruturas danificadas por traumatismos e doenças e é essencial para a manutenção da homeostasia dos organismos vivos.

Todos os procedimentos cirúrgicos devem estar fundamentados nas melhores condições de saúde local e sistêmica para que os processos de reparo possam restabelecer a integridade e arquitetura tecidual prévias. Algumas doenças, como o Diabetes Mellitus (DM), interferem de forma negativa na reparação dos tecidos.

O DM atinge milhões de pessoas ao redor do mundo e é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um problema da saúde pública. O DM é consequência da deficiência de produção de insulina pelo pâncreas ou da resistência tecidual periférica a este hormônio. A doença é caracterizada por alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas levando ao aumento dos níveis de glicose sérica.

O comprometimento da reparação tecidual observado no DM é causado pelo estresse oxidativo resultante do desequilíbrio entre a produção e a degradação de moléculas de oxigênio altamente reativas derivadas do metabolismo celular. Alternativas terapêuticas capazes de contornar as deficiências observadas na reparação dos tecidos sob condições de hiperglicemia constante são importantes para aprimorar o tratamento das feridas crônicas e agudas em pacientes diabéticos.

A ozonioterapia apresenta-se na literatura como uma opção aos tratamentos de feridas quer pelo seu potencial antimicrobiano quer pela capacidade de interferir sobre a reparação dos tecidos. O ozônio é um potente oxidante que em contato com fluídos orgânicos forma espécies reativas de oxigênio capazes de interferir no metabolismo celular por meio de mecanismos de óxido-redução.

Devido a sua alta instabilidade sob a forma gasosa, outras formas de aplicação que ofereçam maior estabilidade têm sido utilizadas, ainda que de forma empírica e sem estudos que verifiquem seus reais efeitos e que possam padronizar as técnicas terapêuticas. Apesar do crescente número de publicações sobre os

benefícios da ozonioterapia, não há referências na literatura sobre a aplicação de ozônio para aprimorar a reparação óssea quando o diabetes está presente.

Diante do exposto, propusemo-nos a estudar o efeito de irrigações realizadas com solução de ozônio diluído em água em feridas ósseas monocorticais produzidas em fêmur de animais induzidos ao diabetes avaliando o processo do reparo sob aspectos histomorfológicos e histomorfométricos.

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 REPARAÇÃO DOS TECIDOS ÓSSEOS

A reparação dos tecidos envolve uma sequência coordenada de fatores bioquímicos e celulares que pode ser dividida em fases sucessivas, que se sobrepõem, denominadas: fase inflamatória, fase de formação de tecido de granulação e deposição de matriz extracelular e fase de remodelação (Balbino et al., 2005; Sen; Roy, 2008).

Os tecidos ósseos reparam-se seguindo a mesma sequência de eventos moleculares observada nos tecidos não ósseos (Tsiridis et al., 2007). O primeiro estágio é caracterizado pelo processo inflamatório, pela formação de coágulo sanguíneo, pela remoção dos restos celulares e da matriz colágena pelos macrófagos e pela formação do tecido de granulação. O segundo estágio consiste na deposição de matriz mineral pelos osteoblastos e pode ocorrer com ou sem a deposição de uma matriz fibrocartilaginosa prévia. Quando não existe contato direto dos fragmentos ósseos, a deposição de colágeno e matriz mineral é precedida pela formação de matriz fibrocartilaginosa (osteogênese endocondral). Quando há contato entre os segmentos ósseos da ferida óssea a formação de tecido ósseo ocorre sem a formação de tecido cartilaginoso (osteogênese intramembranosa) (Shapiro, 2008). A estabilidade da ferida óssea é essencial para a reparação óssea adequada (Klein et al., 2003; Epari et al., 2007). A fase final da reparação óssea é protagonizada pelos osteoclastos e corresponde à remodelação tecido ósseo em sua configuração original (Schindeler et al., 2008; Raggatt; Patridge, 2010).

Os fenômenos de reabsorção e aposição óssea, resultante da atividade dos osteoblastos e osteoclastos, observados no desenvolvimento dos ossos também regem os princípios da reparação dos tecidos ósseos (Schindeler et al., 2008). Os osteoblastos são células comprometidas com a deposição e a calcificação da matriz colágena extracelular. São gerados a partir de células-tronco osteoprogenitoras de origem mesenquimal que quando estimuladas por fatores de crescimento e de transcrição, diferenciam-se em osteoblastos. Quando apresentam baixa atividade

metabólica e estão envolvidos pela matriz óssea, os osteoblastos são denominados osteócitos. Os osteoclastos são derivados dos monócitos, chegam ao tecido ósseo por diapedese e fundem-se para formar um microambiente ácido capaz de reabsorver o tecido mineral. Completa o microambiente celular do tecido ósseo o perióstio e o endóstio. O perióstio é composto por osteoblastos e fibras colágenas. Recobre externamente o osso e abriga a inervação e a irrigação sanguínea que nutrem os ossos. O endóstio é formado por células pavimentosas e abriga a medula óssea recobrando o osso internamente por todo o tecido ósseo medular (Klein et al., 2003).

A fase inflamatória do processo de reparo tecidual tem como característica o déficit no gradiente de oxigênio que estimula a resposta dos osteoblastos por meio da expressão de fatores de transcrição indutíveis por hipoxia (HIFs) (Wang et al., 2007; Semenza, 2009). Segundo Ridlle et al. (2009) os HIFs são necessários para o início da cascata angio-osteogênica.

O processo de reparação dos tecidos ósseos necessita de oxigenação e vascularização da ferida óssea (Kanczler, Oreffo; 2008). A vascularização fornece oxigênio para a osteogênese e os fatores de crescimento que estimulam a neovascularização agem de forma sinérgica com os fatores que favorecem a diferenciação de células mesênquimais osteoprogenitoras e a neoformação óssea (Peng et al., 2005; Samee et al., 2008).

Dentre as moléculas que atuam controlando a reparação tecidual as espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o superóxido (O_2^-) apresentam importante função além de ação antimicrobiana. Em condições fisiológicas normais as ROS são degradadas por enzimas intra e extracelulares que impedem que o excesso de ROS produzidas pelo metabolismo celular seja danoso ao organismo (Wauquier et al., 2009). O estresse oxidativo, condição em que o há excesso de espécies reativas de oxigênio, compromete os processos de anabolismo e catabolismo da reparação tecidual (Hamada et al., 2007).

Em baixas concentrações as ROS atuam como mensageiros que estimulam processos-chave associados aos processos de reparação tecidual incluindo a mobilidade celular, a ação de citocinas, a angiogênese (Kietzmann, Görlach, 2005;

Rodriguez et al., 2008) e a remodelação tecidual (Halleen et al., 1999; Hallen et al., 2003).

As espécies reativas de oxigênio atuam sobre a fase de remodelação das feridas ósseas. O objetivo principal desta fase é restabelecer a arquitetura óssea prévia ao trauma. Esta fase é caracterizada pela reabsorção e neoformação óssea e pode ser definida como formação óssea secundária (Gerstenfeld et al., 2003). A enzima fosfatase ácido tártaro resistente (TRAP), expressada por osteoclastos ativos e células apresentadoras de antígenos, é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio que colaboram com a fase final da reparação óssea degradando a matriz colágena (Halleen et al., 1999; Hallen et al., 2003). A TRAP é largamente utilizada como marcador de osteoclastos em estudos que avaliam a reparação tecidual (Minkin, 1982).

A fonte de células osteoprogenitoras responsáveis pela neoformação e remodelação óssea permanece ambígua. O perióstio é uma fonte rica em células-tronco capazes de se diferenciar e produzir tecido ósseo e quando ausente a recuperação do tecido ósseo frente a uma lesão é retardada (Hutmacher; Sittinger, 2003; Malizos; Papatheodorou, 2005).

O efeito de diferentes drogas e tratamentos sobre as fases sucessivas de reparação tecidual pode ser estudado utilizando-se um modelo de feridas ósseas estáveis realizadas por meio de broca em fêmur de animais experimentais (Nagashima et al., 2005; Pereira et al., 2007; Tanaka et al., 2010). O estudo histológico das perfurações ósseas monocorticais realizadas em fêmures de ratos revela que ao décimo dia há neoformação do trabeculado ósseo. Após 21 dias da realização das feridas há total recuperação da medula hematopoiética e remodelação da cortical óssea (Chiba et al., 2001).

2.2 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é resultado, principalmente de combinações variáveis entre o distúrbio na produção da insulina e da resistência periférica a este

hormônio produzido pelo pâncreas. Esta doença causa alterações no metabolismo intermediário dos carboidratos, lipídios e proteínas. O diabetes é classificado em dois tipos. O DM tipo 1 (DM1) consiste na destruição auto-imune das células β das ilhotas pancreáticas resultando em baixa secreção da insulina. O DM tipo 2 (DM2) é decorrente da resistência periférica à insulina e normalmente é adquirida em idade adulta e está relacionada a obesidade. Os pacientes diabéticos não compensados apresentam sinais claros da síndrome hiperglicêmica como polifagia, poliúria e polidipsia (Andreolli et al., 2002; Maraschin et al., 2010).

A doença DM acomete cerca de seis milhões de brasileiros e aproximadamente cem milhões de pessoas ao redor do mundo (Ministério da Saúde – Brasil, 2006). Até 2030 poderá comprometer 439 milhões de adultos com predominância do aumento da incidência entre a população com mais de sessenta anos de idade nos países em desenvolvimento (Wild et al., 2004; Shaw et al., 2010).

O diabetes apresenta complicações agudas e crônicas. As agudas envolvem principalmente a hipoglicemia, a cetoacidose e os distúrbios eletrolíticos (Zoungas et al., 2010). As complicações crônicas mais comuns são: a nefropatia (Knowler et al., 2005), a retinopatia (Yildirim et al., 2007), a osteoporose (Räkel et al., 2008), as doenças cardiovasculares (Gholap et al., 2010), a neuropatia (Lu et al., 2010) e o comprometimento da reparação dos tecidos ósseos (Macey et al., 1989; He et al., 2004; Mainardes et al., 2007).

O DM1 causa osteopenia em 50-60% dos pacientes e osteoporose em 14-20% (Räkel et al., 2008) principalmente devido à nefropatia e à doença microvascular (Vestergaard et al., 2005; Räkel et al., 2008; Gholap et al., 2010). Saha et al. (2009) encontraram menor densidade mineral óssea (DMO) e menor massa óssea (MO) em jovens e adolescentes DM1 quando comparados com jovens de mesma faixa etária normoglicêmicos. O gênero masculino foi mais afetado com um déficit aproximado de 10% da massa óssea total (Saha et al., 2009). Em uma revisão Blakytyn et al. (2011) descrevem menor conteúdo mineral e protéico observado nos ossos de animais diabéticos, menor atividade da fosfatase alcalina, menor deposição de colágeno pelos fibroblastos e maior desenvolvimento de adipócitos em detrimento de células ósseas.

Os pacientes DM2 apresentam aumento da densidade mineral óssea relacionada principalmente ao baixo equilíbrio metabólico ósseo (Melton et al., 2008). Os efeitos anabólicos da hiperinsulinemia, característica do DM2, podem ser associados ao aumento da densidade mineral óssea (Räkel et al., 2008). Alguns autores sugerem que a diferente apresentação clínica da doença pode ser creditada à discrepância entre a concentração sistêmica de insulina presente em DM1 e DM2, hipoinsulinemia e hiperinsulinemia respectivamente (Thraill et al., 2005).

A osteopenia e a reparação óssea prejudicada em consequência do DM estão intimamente ligadas ao aumento do estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade regulatória do sistema antioxidante endógeno (Sepúlveda et al., 2008). Em condições de hiperglicemia pode ocorrer o aumento do estresse oxidativo resultante do aumento de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) (Hamada et al., 2009). López-Ibarra et al. (2001) e Musumeci et al. (2010) estudaram alterações da diferenciação de osteoblastos decorrente do estresse oxidativo presente no DM resultando em osteopenia e aumento do risco de osteoporose e de fraturas que podem afetar a reparação dos tecidos mineralizados de forma grave.

Quatro mecanismos básicos são responsáveis pela produção aumentada de ROS. O primeiro é o aumento do fluxo da via poliol; o segundo caracterizado pelo aumento dos produtos finais avançado da glicosilação (*advanced glycation end-products*, AGEs); o terceiro baseado na ativação de isoformas da proteína C quinase (*protein kinase C*, PKC) e finalmente o aumento da via da hexosamina (*hexosamine biosynthesis pathway – HBP*) (Brownlee, 2001).

A via poliol é uma cascata de reações químicas que tem como objetivo reduzir aldeídos tóxicos a alcoóis inativos por meio da enzima intracelular aldose redutase (AR). A atividade desta enzima consome o antioxidante NADPH expondo a célula a danos causados pelo estresse oxidativo (Brownlee, 2001; Brownlee, 2005).

Os AGEs são proteínas não enzimáticas que sofrem a adição de radicais glicosilados e acumulam-se em diversos órgãos, inclusive nos tecidos ósseos. Estas proteínas interagem com receptores específicos (RAGEs) produzindo ROS nas células endoteliais e musculares lisas, o que contribui para o desequilíbrio

metabólico característico das complicações diabéticas e as lesões microvasculares em retina, rins, nervos e periodonto (Ruderman et al., 1992; Lalla et al., 2000; Brownlee, 2001; Goldin et al., 2006).

Santana et al. (2003) avaliou a expressão de AGEs e a reparação dos tecidos ósseos em um modelo de feridas monocorticais realizadas na calvária de animais induzidos ao diabetes com estreptozotocina (STZ). A correlação dos resultados mostrou que a presença de RAGEs comprometeu cerca de 40% a reparação dos defeitos ósseos.

A família da proteína C quinase (PKC) é um conjunto de onze enzimas que participam de diversas cascatas de mensageiros intracelulares e distribuem-se de forma específica entre os tecidos (Avignon; Sultan, 2006). A ativação das isoformas da PKC leva a anormalidade no fluxo sanguíneo microvascular por meio da diminuição da expressão de óxido nítrico (NO) e aumento da atividade de endotelina-1 (Brownlee, 2001). A PKC induz o aumento da permeabilidade dos glomérulos renais (Das Evcimen; King, 2007) e danos estruturais ao endotélio microvascular (Geraldes; King, 2010) e contribui para o aumento do risco de doenças cardiovasculares (Avogaro et al., 2006).

A via da hexosamina (HBP) é uma via sinalizadora da via glicolítica pela qual cerca de 2 – 5 % da glicose intracelular é metabolizada (Chatham et al., 2008). A ativação excessiva do fluxo da hexosamina apresenta efeitos deletérios associados ao DM2, como resistência insulinêmica, aumento do estresse oxidativo e apoptose (Marshall et al., 1991; Rajamani; Essop, 2010). Estudos que utilizaram cultura celular mostraram relação do aumento da expressão do HBP com o risco de doença cardiovascular associado ao DM (Kohda et al., 2009).

Os eventos bioquímicos associados com hiperglicemia crônica estão ligados ao aumento do estresse oxidativo. Evidências sugerem que a lesão celular oxidativa causada pelos radicais livres contribuem para o desenvolvimento das complicações no diabetes tipo 1 (DM1) e a diminuição das defesas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas) parecem correlacionar-se com a gravidade das alterações patológicas no DM1 (Sepúlveda et al., 2008).

A propedêutica clínico-cirúrgica dos pacientes diabéticos preconiza a avaliação de fatores que possam colaborar para proporcionar as melhores condições para a reparação tecidual (Gregori; Campos, 2004).

2.3 DIABETES MELLITUS E REPARAÇÃO ÓSSEA

A vasculopatia periférica, comum no DM crônico, é uma doença que acomete principalmente a microvascularização. Os altos níveis intracelulares de glicose e de glicólise levam a formação de produtos que são tóxicos às células endoteliais e que predispõe à vasodilatação. A vascularização se torna funcionalmente anormal, a perfusão do oxigênio diminui conduzindo a um estado de hipóxia tecidual que representa importantes limitações ao processo normal de reparação tecidual (Nishikawa et al., 2000; Yildirim et al., 2007; Pérez-Matute et al., 2009).

A função de diversos tipos celulares necessários ao processo de reparação dos tecidos pode estar prejudicada no diabetes. Liu e Velásquez (2008) observaram que o número e a função das células progenitoras endoteliais podem ser afetados durante o diabetes não compensado. Os autores comentam que estes mecanismos, apesar de ainda não estarem muito bem esclarecidos, estão relacionados a fatores indutíveis pela hipóxia tecidual (HIFs).

Thraill et al. (2005) e Diniz et al. (2008) descrevem alterações da neoformação óssea, atrasos na consolidação de fraturas, pobre formação de calo ósseo, consolidação insuficiente e instável das fraturas em condições de hiperglicemia constante como na doença Diabetes Mellitus (DM).

He et al. (2004) e Mainardes et al. (2007) relatam alterações na neoformação óssea em fraturas em condições de hiperglicemia constante, como insuficiência e instabilidade bem como pobre formação de calo ósseo.

Liu et al. (2006) e Kayal et al. (2009) observaram que em ratos diabéticos houve aumento da resposta inflamatória em doença periodontal induzida, aumento da atividade dos osteoclastos, e menor neoformação óssea, capazes de comprometer a reparação óssea.

Bedi et al. (2010) utilizaram análises bioquímicas, histomorfométricas e imunoistoquímicas para estudar a reparação do tendão da articulação da pata superior de ratos após a sua separação cirúrgica. O autor encontrou menor formação de tecido cartilaginoso, menor formação de colágeno organizado e maior deposição de AGEs na interface osso-tendão. Estes resultados confirmam que a hiperglicemia não controlada compromete a reparação dos tecidos ósseos em animais experimentais.

Quando há o controle restrito da glicemia as respostas teciduais são similares às encontradas sob ausência de distúrbios do metabolismo da glicose (de Moraes et al., 2009; Advance Collaborative Group, 2008).

Follak et al. (2004) avaliaram a reparação de defeitos ósseos de diferentes tamanhos em fêmures de animais diabéticos concluindo que defeitos ósseos maiores que 1,2mm apresentaram prejuízo na mineralização após o décimo quarto dia. Animais diabéticos que apresentaram controle da glicemia com o uso de insulina exógena apresentaram reparação satisfatória.

2.4 APLICAÇÃO DO OZÔNIO E A REPARAÇÃO TECIDUAL

O ozônio (O_3) é uma molécula instável composta por três átomos de oxigênio. Este gás é encontrado na estratosfera terrestre onde é produzido pela ação dos raios ultravioleta sobre o oxigênio (Rubin, 2001). Comparado ao oxigênio (O_2) o ozônio apresenta uma solubilidade 50% maior em água (Buliés, 1996; Bocci, 2004a). Quando diluído em água pura o ozônio torna-se estável por horas dependendo da temperatura ambiente, da pressão atmosférica e concentração de produção pela fonte do gás. Sob estas condições a instabilidade do ozônio se modifica sendo que parte das moléculas de decompõem rapidamente e parte permanecem estáveis (von Gunten, 2003; Stübinger et al., 2006). Por ser um potente oxidante, tem sido muito utilizado como agente antimicrobiano na indústria de alimentos, no saneamento ambiental e de água potável (Bocci, 2008).

Desde a Primeira Guerra Mundial os efeitos do uso de agentes oxidativos, como o ozônio, são estudados para o tratamento de feridas crônicas de pacientes

portadores do diabetes devido à sua ação antimicrobiana, capacidade de estimular a reparação tecidual e a resposta imunológica (Bocci, 2004a, 2006; Grootvelt et al., 2004; Re et al., 2008).

Fisch¹ (1933 apud Fillippi, 1997) foi o pioneiro em utilizar o ozônio em odontologia para o tratamento de cáries e infecções periodontais crônicas. O cirurgião alemão Dr. Erwin Payr² (1935 apud Azarpazhooh; Limeback, 2008) utilizou o ozônio diluído em água em cirurgias bucais para promover hemostasia, melhorar oxigenação local e inibir a proliferação bacteriana.

O contato da molécula de ozônio com fluidos orgânicos acarreta a formação de moléculas reativas de oxigênio, que influenciam eventos bioquímicos do metabolismo celular, o que pode segundo alguns autores proporcionar benefícios à reparação tecidual (Fillippi, 1997; Cruz et al. 1997; Cardoso et al. 2000; Re et al., 2008).

A atividade do oxigênio na reparação tecidual não se restringe ao componente antimicrobiano, mas também atua nos processos de oxido-redução que modulam a reparação tecidual (Bocci, 2004b, 2006; Sen; Roy, 2008).

A molécula de ozônio reage com ácidos lipídicos poli-insaturados, com antioxidantes como o ácido ascórbico e o ácido úrico e com o componente tiol (grupo-SH) encontrado na cisteína, na glutamina reduzida e na albumina, levando, entre outros, à formação de água e produtos oxidativos lipídeos (POLs). Inúmeros estudos têm sido realizados para elucidar os efeitos tóxicos e estabelecer a dose terapêutica correta de aplicação do ozônio (Pryor et al., 1995). Dependendo da dose utilizada do ozônio, também podem ser danificados carboidratos, proteínas e estruturas do DNA e RNA (Bocci, 2006).

Bons resultados foram observados com o uso terapêutico do ozônio no tratamento de pacientes com neuropatia diabética (Batista et al., 2001), doenças oftálmicas (Vigna; Menéndez-Cepero, 2007), exposições ósseas pós-trauma (Buliés, 1996), artropatias degenerativas (Buliés et al., 1997), doenças respiratórias (Gent et al., 2003), insuficiência renal aguda (Calunga et al., 2009), tratamento de

¹ Fisch EA. Die ozontherapie in der Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde [Thesis]. Bonn, Germany: Rheinische Friedrich Willhens Universität; 1934

² Payr E. Über Ozonbehandlung in der Chirurgie. Münch, Med Wochenschr. 1935; 82:220-91.

osteonecrose avascular (Agrillo et al., 2006) e no tratamento de outras doenças (Martínez-Sánchez et al., 2005; Cosma et al., 2003).

A toxicidade do ozônio é hoje bem conhecida e controlável, e após décadas de estudos clínicos e experimentais, este gás é considerado por muitos autores, terapêutico, seguro e não tóxico quando em concentrações apropriadas (Batista et al., 2001; Bocci, 1996, 2006, 2008).

Os efeitos tóxicos locais e sistêmicos deste gás no sistema pulmonar, quando respirados, incluem hiperatividade das vias aéreas, aumento da permeabilidade macromolecular epitelial, infiltração de neutrófilos e hipersecreção de muco (Pryor et al., 1995).

Re et al. (2008) relatam que ozônio em baixas doses é capaz de promover uma pré-condição oxidativa por meio do aumento e preservação de sistemas endógenos antioxidantes. Os autores descrevem que este gás promove a regularização da concentração endógena de óxido nítrico e mantém um adequado balanço redox (Re et al., 2008).

O peróxido de hidrogênio, gerado pelo contato do ozônio com os tecidos, atua como molécula sinalizadora intracelular, capaz de interagir com diferentes tipos celulares. Em contato com eritrócitos aumenta a glicólise, a formação de ATP e o transporte de oxigênio para os tecidos. Ativam os neutrófilos e os leucócitos aumentando a produção de interleucinas e citocinas, capazes de favorecer a resposta do sistema imune. Proporciona o aumento da atividade plaquetária e o aumento da liberação de autacóides e fatores de crescimento capazes de contribuir para a reparação tecidual. (Bocci, 2004^a, 2006).

O ozônio é capaz de aumentar a expressão de citocinas pró inflamatórias, como a Interleucina-1 (IL-1) e o Fator- α de Necrose Tumoral (TNF- α), em vias de respostas de inflamação como a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), e na ativação gênica de queratinócitos através da via NFkappa β . Feridas dérmicas submetidas à aplicação de óleo ozonizado apresentaram aumento significativo da proliferação de fibroblastos e fibras colágenas após sete dias de reparação tecidual, quando comparadas ao grupo controle (Kim et al., 2009).

O conceito de estresse oxidativo inclui hipertermia, hipóxia, isquemia, hipoglicemia e alterações do pH. Em doses não tóxicas, a aplicação do ozônio

representa um estresse oxidativo agudo, não deletério, que induz uma resposta celular antioxidante capaz de reverter o estresse oxidativo crônico existente. O resultado da resposta antioxidante é o aumento da vasodilatação local e da angiogênese, da liberação de citocinas e de fatores de crescimento que, juntamente com a atividade antimicrobiana que o ozônio possui, representam elementos cruciais no tratamento de diversas doenças metabólicas, inflamatórias, infecciosas ou ainda neoplásicas (Bocci, 1996, 2006).

A aplicação do ozônio diluído em água também tem sido objeto de investigação. O trabalho experimental de Cardoso et al. (2000) verificou que a administração oral de água ozonizada (concentração de $0,6\mu\text{g ml}^{-1}$) pôde diminuir a ocorrência e a gravidade de úlceras gástricas induzidas e atenuou o edema de lesões dérmicas induzidas. Baseados nos resultados, os autores sugerem que a água ozonizada participa como modulador específico do processo inflamatório por indução gradual do estresse oxidativo (Cardoso et al., 2000).

Diversos autores descrevem o uso da água ozonizada para diferentes tratamentos cirúrgicos odontológicos, sem contanto compreender totalmente o mecanismo pelo qual a ação do ozônio leva aos efeitos observados (Fillippi, 1997; Krozer et al., 1999; Ebensberger et al., 2002).

Os efeitos antissépticos do ozônio foram estudados por Huth et al. (2006). A ação antimicrobiana e a ausência de desenvolvimento de resistência farmacológica foram notadas na purificação de água de abastecimento e preservação de alimentos.

Estudos experimentais em animais verificaram que o ozônio diluído em água (4ppm) não apresentou efeito tóxico quando utilizado em irrigações trans-operatórias de feridas dérmicas e mostrou interferência no processo de reparação tecidual no tocante a contração da ferida e na formação de matriz extracelular. Em animais sistemicamente saudáveis a concentração de 4ppm de ozônio em água favoreceu uma contração maior no processo de reparo tecidual (Traina et al., 2007; Traina, 2008).

Em um estudo em humanos, as irrigações com a solução de ozônio diluído em água na concentração de quatro (4) ppm quando utilizadas para antisepsia imediata de alvéolos pós-exodontia diminuiu a colonização de microrganismos

anaeróbios presentes no interior de alvéolos dentários e não mostraram efeito tóxico clínico no processo de reparo tecidual das feridas alveolares (Deboni, 2008).

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DO DIABETES MELLITUS

O método mais efetivo para a indução do DM de forma similar à doença encontrada em seres humanos é a remoção cirúrgica do pâncreas. Porém noventa e cinco por cento do órgão deve ser removidos para que as ilhotas de Langerhans remanescentes não hipertrofiem e suplantem a secreção de insulina capaz de manter os níveis glicêmicos séricos (Rees; Alcolado, 2005).

O modelo de indução química do DM pode ser realizado por meio do uso Aloxane e do uso da Estreptozotocina (Streptozotocin - STZ). O aloxane leva à destruição rápida das células β pancreáticas por meio de um mecanismo de estresse oxidativo resultante do metabolismo da droga associado ao um rápido fluxo de cálcio para o meio intracelular (Carvalho et al., 2005; Akbarzadeh et al., 2007; Etuk; Muhammed, 2010).

Um dos modelos mais bem caracterizados para se estudar o impacto do diabetes no tecido ósseo em ratos e camundongos é a indução do diabetes tipo-1 pela administração de Estreptozotocina. A aplicação de STZ leva as células β pancreáticas à necrose conduzindo à hipoinsulinemia e hiperglicemia (Akbarzadeh et al., 2007; Ogasawara et al., 2008).

A STZ foi identificada em 1950 em uma cepa da bactéria *Streptomyces achromogenes* encontrada em plantações de soja. Em 1960 foi comprovada a atividade citotóxica seletiva sobre as células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas sendo sugerida a sua utilização para indução experimental de DM e para o tratamento quimioterápico de neoplasias pancreáticas (Gichne et al., 1968; Murray-Lyon et al., 1968).

Esta droga é levada para o espaço intracelular pelas proteínas transportadoras de glicose localizadas na membrana plasmática. O metabolismo da STZ produz, entre outros compostos, óxido nitroso (NO) que em contato com o O_2

gera uma toxina capaz de agredir proteínas e material genético (DNA). O sistema de reparo do DNA utiliza grande quantidade de NAD (nicotinamida difosfato) e ATP (adenosina tri-fosfato) gerando alto estresse oxidativo e morte celular (Van Dyke et al., 2010).

O modelo experimental de indução de DM com STZ pode ser aplicado para estudos que avaliem a reparação óssea com resultados satisfatórios. Reddy et al. (2001) encontraram alterações na integridade biomecânica de ossos longos em ratos induzidos ao DM com STZ que necessitavam de menor força para fraturar fêmures e tíbias, mesmo após a eutanásia dos animais.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar, comparativamente, os efeitos da irrigação trans-operatória de solução de ozônio diluído em água, sobre feridas ósseas monocorticais realizadas em fêmures de ratos Wistar, induzidos ou não ao diabetes, considerando os aspectos histomorfológicos e histomorfométricos da reparação óssea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado em 2 de março de 2009 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP, subcomissão de pesquisa experimental animal seguindo as normas do COBEA sob protocolo CEP-FOUSP 04/2009 (Anexo A).

Todos os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados junto ao Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia Prótese e Traumatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. O material para o estudo histológico da reparação tecidual foi processado e avaliado junto ao Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal e junto ao Laboratório de Informática dedicado a Odontologia (LIDO) da Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo.

4.1 MATERIAL

Sessenta (60) ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos com peso entre duzentos e duzentos e cinquenta gramas (200g – 250g), e idade aproximada de sessenta (60) dias provenientes do Biotério Central do Instituto de Pesquisas Nucleares (IPEN) foram selecionados para o estudo. Os animais, durante todo o período da pesquisa foram mantidos em gaiolas de polipropileno ventiladas, forradas com maravalha de madeira esterilizada, com ciclo dia/noite de 12/12 horas e alimentados por meio de ração para roedores (Labina for Rodents - Purina®) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo D, (n=30) cujos animais foram induzidos ao diabetes e o grupo N (n=30), cujos animais não sofreram indução. A Tabela 4.1 ilustra a distribuição dos animais dentro dos grupos.

Tabela 4.1 - Distribuição dos animais nos períodos e grupos controle e experimentais

TEMPO			H ₂ O+O ₃			H ₂ O			TOTAL
			7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	30
GRUPO	D	Nº de animais	5	5	5	5	5	5	
			15			15			
	N	Nº de animais	5	5	5	5	5	5	
			15			15			
									30

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Indução ao Diabetes

Trinta (30) animais foram submetidos a jejum de 16 horas anteriormente à indução ao diabetes realizada por meio da administração de injeção única, via intraperitoneal, de 60mg/Kg de Estreptozotocina (Streptozotocin - STZ - Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) dissolvida em 0,1mL de solução tampão citrato de sódio (pH 4,5). O grupo controle (N), composto por 30 animais, foi submetido à injeção de dose única de 0,1mL de tampão citrato de sódio pela via intraperitoneal. Todos os animais tiveram as suas massas aferidas previamente à administração da STZ.

Setenta e duas (72) horas após a administração da droga STZ as taxas de glicemia foram aferidas nos animais do grupo N e D por meio de um glicosímetro capilar Accucheck (Roche®) utilizando-se sangue coletado de ferida realizada na extremidade distal da cauda dos animais utilizando-se de secção por tesoura de ponta fina. A mesma mensuração foi repetida durante o pré-operatório imediato de todos os animais. Foram considerados pertencentes ao grupo D os animais que apresentaram glicemia entre 200mg/dL e 500mg/dL nas duas medições realizadas.

Os pâncreas dos animais do grupo D foram removidos após a eutanásia para análise das células β das ilhotas pancreáticas e comprovação da existência ou não de DM1 por meio de observação de cortes histológicos por microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400X.

4.2.2 Produção da Água Ozonizada

A água ozonizada foi obtida pela diluição do gás ozônio, produzido por um gerador (Ozone & Life®3.0). O gás foi produzido utilizando uma fonte de oxigênio medicinal regulada por um fluxômetro de precisão (Rotarex®, USA) para um fluxo de 1ml/min. A quantidade de ozônio produzida pelo gerador, na posição 10 do potenciômetro, atingiu a concentração de produção de 47,7mg O₃/L seguindo a calibração do aparelho pelo fabricante.

O ozônio gerado foi transportado por uma mangueira de silicone para uma coluna de vidro de 1,58m de altura contendo dois litros de água MilliQ® (Millipore™). O gás foi diluído no meio aquoso por meio de uma pedra porosa de vidro durante dez (10) minutos. A concentração final de O₃ diluído em água atingiu 4ppm de O₃ e foi monitorada empregando-se um analisador colorimétrico obtido pelo kit Chemets™ (modelo R-7204 - Chemetrics™, INC-USA).

A temperatura e umidade relativa do ar do ambiente foram monitoradas todos os dias em que a água ozonizada foi produzida. A água ozonizada foi utilizada para o procedimento experimental imediatamente após sua produção e durante o intervalo entre as cirurgias foi armazenada em tubo de vidro hermeticamente fechado por tampa de Teflon®.

4.2.3 Procedimentos Cirúrgicos

Todos os procedimentos cirúrgicos descritos a seguir seguiram os princípios gerais e fundamentais da cirurgia e protocolos de esterilização e anti-sepsia

adotados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia.

PRÉ-OPERATÓRIO

- Administração de antibiótico profilático: benzil penicilina benzatina (Roche®) na dose de 40.000UI/Kg via intramuscular.
- Aferição do peso de todos os animais previamente ao ato operatório.
- Antissepsia com álcool 70° na porção distal da cauda dos animais para obtenção de gota de sangue para a mensuração da taxa glicêmica.
- Aferição da glicemia setenta e duas (72) horas após a indução ao DM e no momento pré-operatório em todos os animais.
- Anestesia geral pela aplicação do anestésico via intramuscular na dose de 0,8mg/kg (cloridrato de cetamina, Dopalen® - Vetbrands) e do relaxante muscular via intramuscular na dose de 0,3mg/kg (cloridrato de xilazina, Rompum® - Bayer SA) na musculatura femoral da pata direita dos animais.
- Tricotomia na pata traseira esquerda do animal, em área dimensionada para a realização das incisões e acesso cirúrgico ao fêmur.

TRANS-OPERATÓRIO

- Anti-sepsia da pele da pata e regiões expostas ao campo operatório com Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI – Geyer®) 10%.
- Incisão retilínea da pele realizada por meio de bisturi, lâmina 11, paralela ao longo eixo do fêmur, na região lateral da pata traseira esquerda do animal.
- Divulsão dos tecidos por meio de espátula de Freer e exposição da musculatura da região da pata traseira do animal.
- Perfuração sobre a face ântero-lateral do terço proximal da diáfise do fêmur, por meio de uma broca trefina, com diâmetro de 2 mm (DENTOFLEX®) acoplada a um motor elétrico de baixa rotação sob irrigação constante, por 10 minutos com 100 ml de água Milli-Q® com 4

ppm de ozônio ou sem a diluição de ozônio, de acordo com o grupo experimental.

- Após as irrigações, os procedimentos de síntese das feridas cirúrgicas foram realizados por sutura por planos empregando fio de seda 3.0 (Ethicon – Johnson & Johnson®) para musculatura e fio de Nylon 3-0 (Brasuture®) para a pele.

Figura 4.1 - Exposição do fêmur

Figura 4.2 - Perfuração óssea monocortical

4.2.4 Eutanásia dos Animais

- Após períodos de 7, 14 e 21 dias os animais de cada grupo foram eutanasiados, individualmente, em câmara de CO₂.
- As peças anatômicas foram obtidas por incisão da pele, dissecação da musculatura da pata do animal e desarticulação da cabeça do fêmur.
- Dissecação dos tendões e remoção do fêmur.
- Fixação da peça cirúrgica em formalina a 10%.
- Aquisição do pâncreas do animal através de incisão crânio-caudal da pele do abdômen do animal, dissecação da musculatura e tecidos abdominais, dissecação do fígado, dissecação do pâncreas utilizando tesouras de ponta romba e fixação em formalina a 10%.

4.2.5 Preparação das Amostras Histológicas

- Após a fixação das peças cirúrgicas em formalina por quarenta e oito (48) horas, os fêmures foram imersos em solução de EDTA 10% (pH=7.4) durante 6 semanas para desmineralização do tecido ósseo.
- O processamento das peças para os estudos histológicos seguiu o protocolo padrão utilizado pelo Laboratório de Patologia Bucal da FOU SP.
- Os fêmures foram incluídos em blocos de parafina e cortados paralelamente ao seu maior eixo, centralmente à ferida óssea, com espessura de 4,5µm e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

4.2.6 Análise Histomorfológica

As lâminas das peças cirúrgicas foram analisadas por microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400x, seguindo os procedimentos adotados pelo Laboratório de Patologia Bucal.

A análise dos aspectos histomorfológicos do reparo ósseo foi realizada de forma cega por dois observadores independentes que avaliaram as seguintes características da reparação tecidual: infiltrado inflamatório, presença de necrose, hemorragia, vasos neoformados e neoformação óssea. Os parâmetros descritos anteriormente foram ponderados por meio de uma escala arbitrária classificada de zero a três (0 = ausente; 1 = pouco; 2 = moderado; 3 = intenso).

4.2.7 Análise Histomorfométrica

Imagens de dois cortes de cada animal foram obtidas das lâminas histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina capturadas por câmera tipo CCD (Sony®) acoplada a microscópio Jeol® e placa de digitalização de imagens (Captivator®) e transferidas para software de morfometria digital (ImageLab 2000®). As imagens do campo histológico (aumento de 400x) na região da perfuração óssea do fêmur do animal foram digitalizadas e analisadas (em porcentagem de pixels) quanto à quantidade de trabéculas ósseas neoformadas, permitindo estimar a evolução do processo de neoformação óssea em cada tempo experimental.

A metodologia de estudo histomorfométrico foi padronizada pelo Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia da Faculdade (LIDO-FOUSP). Foi aferida a porcentagem de pixels presentes dentro do intervalo entre o início e o término da curva de frequência no histograma obtido pelo software Imagelab2000® que envolvesse a maior região da ferida representativa da área de formação de trabéculas ósseas evitando-se áreas de artefato ou espaços em branco.

Para cada corte foram quantificados, de forma cega, nove (9) campos consecutivos nas feridas (três em cada borda, três na região central da perfuração óssea), nos períodos de 7 e 14 dias e 21 dias, conforme a ilustração 4.1.

Figura 4.3 - Esquema apresentando a distribuição, dentro da ferida óssea, dos campos analisados pela histomorfometria

4.2.8 Análise Estatística

4.2.8.1 Análise Estatística de Uniformidade dos Grupos Experimentais

Foi aplicado o Teste de Uniformidade de Kolmogórov-Smírnov, utilizando o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0, com o intuito de verificar o grau de uniformidade dos valores, obtidos pela histomorfometria, dentro de cada um dos quatro grupos estudados e em cada período.

4.2.8.2 Análise Estatística das Variáveis de Interesse

Foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, utilizando o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre as médias das porcentagens de trabéculas ósseas entre os animais diabéticos e não diabéticos (D e N) que receberam irrigações com ozônio diluído em água ou por água Milli-Q[®] pura dentro de cada tempo experimental (7, 14 e 21 dias pós-operatórios).

Foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis, utilizando o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os grupos e subgrupos experimentais e controle (D H₂O+O₃; D H₂O; N H₂O+O₃ e N H₂O), quando comparados concomitantemente, em cada momento de observação.

5 RESULTADOS

Da amostra inicial de sessenta (60) animais. Onze (11) não foram incluídos no estudo por apresentarem fratura no período pós-operatório, detectadas durante as disseções pós-eutanásia. Um (1) animal, diabético, que não recebeu O₃, não foi considerado para as análises por apresentar infecção na ferida cirúrgica após sete (7) dias pós-operatórios caracterizada por abscesso exibindo secreção purulenta.

A amostra de estudo final foi composta por quarenta e oito animais (n=48) divididos em dois grupos (D e N) divididos cada um em dois subgrupos (n=12).

A glicemia capilar média aferida nos animais do grupo D foi de 443,75mg/dL, (de 323mg/dL a 563mg/dL), Os animais que não foram induzidos ao diabetes apresentaram glicemia média de 83 mg/dl. Os animais apresentaram peso médio de 231g (de 210g a 250g), como pode ser observado no Anexo B.

Os cortes histológicos dos pâncreas dos animais induzidos ao diabetes revelaram necrose das ilhotas de Langerhans comprovando o efeito da STZ sobre o tecido pancreático.

A temperatura e a umidade relativa do ar ambiente apresentaram médias de 24,7°C e 60% respectivamente nos dias que a água ozonizada foi produzida. A concentração de ozônio diluído na água pura manteve-se constante em 4 ppm ou 4mg/L.

5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

5.1.1 Período de Sete (7) Dias Pós-Operatórios

A análise histomorfológica do grupo N revelou que nos espécimes submetidos à aplicação da solução de ozônio diluído em água foi possível observar intenso infiltrado inflamatório e áreas hemorrágicas no centro da lesão. O trabeculado ósseo presente nos cortes histológicos dos animais pertencentes ao

grupo N (H_2O+O_3) apresentou características de imaturidade nos limites entre a lesão e a medula hematopoiética. A área central das lesões apresentou células em proliferação à semelhança de um calo ósseo em fase inicial de formação. Os animais do grupo não diabético, não submetidos à irrigação por meio de água ozonizada (N H_2O) mostraram trabéculas ósseas distribuídas de maneira uniforme por toda a extensão da lesão, em maior número, com linhas de aposição evidentes. A medula hematopoiética apresentou-se infiltrada na base das lesões e foi possível constatar recuperação da integridade do perióstio.

As lesões ósseas observadas nos animais induzidos ao DM1 que não receberam a ozonioterapia apresentaram hemorragia extensa, pequena quantidade de infiltrado inflamatório e trabeculado ósseo imaturo nos limites das lesões. A análise das lâminas dos animais induzidos ao diabetes em que foram aplicadas as irrigações por ozônio diluído em água permitiu notar menor tecido hemorrágico, porém infiltrado inflamatório similar ao observado nos animais do grupo D sem irrigações por água ozonizada. As trabéculas ósseas estavam distribuídas de forma uniformes e mais imaturas em relação ao controle negativo.

Todos os animais nos quais foram realizadas a irrigação das feridas ósseas com água ozonizada foi possível observar intensa neoformação de vasos sanguíneos distribuídos por toda a lesão conforme pode ser observado nas figuras 5.1 e 5.2 e pela Tabela 5.1.

5.1.2 Período de Quatorze (14) Dias Pós-Operatórios

A observação das lâminas referentes ao grupo de animais não diabéticos (N H_2O+O_3) cujas feridas ósseas foram irrigadas com água ozonizada revelou a presença de pouco infiltrado inflamatório, medula hematopoiética adjacente aos limites da ferida óssea e trabeculado ósseo menos maduro quando comparado ao grupo controle (N H_2O) que apresentou trabéculas ósseas menores e mais maduras. É importante salientar que as áreas de trabéculas imaturas, aparentemente, estão sendo remodeladas a partir das periferias das feridas.

As lâminas dos animais diabéticos submetidos à ozonioterapia (D $H_2O+ O_3$) mostraram extensas áreas hemorrágicas, proliferação de vasos sanguíneos,

neoformação de trabéculas ósseas em fase menos adiantada e com maior infiltração de medula hematopoiética quando comparados aos animais diabéticos controles (N H₂O). Os resultados acima descritos podem ser observados nas Figuras 5.1 e 5.2 e pela Tabela 5.1.

5.1.3 Período de Vinte E Um (21) Dias Pós-Operatórios

As feridas dos animais não diabéticos em que o ozônio diluído em água foi aplicado (N H₂O+O₃) revelaram a presença de trabeculado ósseo imaturo, invasão da medula hematopoiética e formação da cortical óssea incompleta. Nos animais do grupo controle foi possível observar pouca presença de trabéculas ósseas, invasão do tecido medular e neoformação da cortical óssea quase na totalidade (N H₂O).

A análise das feridas dos animais diabéticos que receberam a ozonioterapia mostrou maior presença de infiltrado inflamatório e tecido hemorrágico, penetração da medula hematopoiética, e presença de trabéculas ósseas próximas à região mais superficial das lesões e cortical óssea não totalmente formada. As feridas nos diabéticos que não foram submetidos à aplicação de ozônio diluído em água foi possível notar a presença de menor quantidade de trabéculas ósseas em comparação aos animais do grupo D que receberam a ozonioterapia. Em ambos os grupos de animais diabéticos foi possível observar extensa substituição da medula óssea hematopoiética por tecido gorduroso.

Os resultados acima estão descritos na Tabela 5.1 e estão ilustrados pelas Figuras 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 - Resultado da avaliação histomorfológica quantitativa arbitrária dos cortes histológicos nos grupos e períodos

Aspectos histológicos observados	Período	D		N	
		H ₂ O + O ₃	H ₂ O	H ₂ O + O ₃	H ₂ O
Infiltrado inflamatório	7 dias	1	1	3	2
	14 dias	2	2	1	1
	21 dias	2	1	1	0
Necrose	7 dias	0	0	0	0
	14 dias	0	0	0	0
	21 dias	0	0	0	0
Hemorragia	7 dias	2	3	2	2
	14 dias	3	2	2	2
	21 dias	2	1	1	0
Edema	7 dias	3	3	3	2
	14 dias	3	2	2	1
	21 dias	2	2	2	1
Neoformação de vasos sanguíneos	7 dias	3	2	3	2
	14 dias	3	2	3	2
	21 dias	2	1	2	1
Infiltração da Medula Hematopoiética	7 dias	2	1	2	2
	14 dias	3	2	2	3
	21 dias	3	2	3	3
Neoformação de trabéculas ósseas	7 dias	1	1	1	2
	14 dias	3	2	2	3
	21 dias	2	3	1	1

Figura 5.1 - Fotomicrografias das feridas ósseas, de cada grupo e período (HE - aumento 250x). (A - D): Imagens das feridas cirúrgicas após sete dias de reparação. Em A: Grupo N H_2O ; em B: Grupo N H_2O+O_3 ; em C: Grupo D H_2O e em D: Grupo D H_2O+O_3 . (E - H): Imagens das feridas cirúrgicas após quatorze dias de reparação. Em E: Grupo N H_2O ; em F: Grupo N H_2O+O_3 ; em G: Grupo D H_2O e em H: Grupo D H_2O+O_3 . (I - L): Imagens das feridas cirúrgicas após vinte e um dias de reparação. Em I: Grupo N H_2O ; em J: Grupo N H_2O+O_3 ; em K: Grupo D H_2O e em L: Grupo D H_2O+O_3 .

Figura 5.2 - Fotomicrografias das feridas ósseas, de cada grupo e período (HE - aumento 400x). Imagens das feridas cirúrgicas após sete dias de reparação. Em A: Grupo N H_2O ; em B: Grupo N H_2O+O_3 ; em C: Grupo D H_2O e em D: Grupo D H_2O+O_3 . (E - H): Imagens das feridas cirúrgicas após quatorze dias de reparação. Em E: Grupo N H_2O ; em F: Grupo N H_2O+O_3 ; em G: Grupo D H_2O e em H: Grupo D H_2O+O_3 . (I - L): Imagens das feridas cirúrgicas após vinte e um dias de reparação. Em I: Grupo N H_2O ; em J: Grupo N H_2O+O_3 ; em K: Grupo D H_2O e em L: Grupo D H_2O+O_3 .

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Os resultados obtidos por meio das análises histomorfométricas permitiram quantificar a formação de trabéculas ósseas de cada grupo experimental e em cada período estudado.

As avaliações histomorfométricas foram realizadas em dois (2) cortes histológicos de cada animal. Apenas os cortes histológicos de dois (2) animais, um do grupo N H₂O de 21 dias e um do grupo D H₂O de 21 dias não permitiram a avaliação histomorfométrica por problemas de processamento laboratorial das peças. Ao total foram analisados 92 cortes histológicos.

No período de observação de sete dias pós-operatórios foram realizadas observações em nove (9) campos da ferida. Nos períodos de quatorze e vinte e um dias pós-cirúrgicos foram observados entre cinco e seis (5-6) campos em cada corte. Ao total foram avaliados 703 campos entre todos os grupos.

Os valores obtidos representam a porcentagem de pixels correspondentes às trabéculas ósseas neoformadas. Os valores originais de todos os dados obtidos na histomorfometria estão apresentados no Anexo C. As médias dos valores obtidos na leitura dos campos para cada animal de cada grupo e para cada período estão expressas na Tabela 5.2 e no gráfico 5.1.

Tabela 5.2 - Médias da porcentagem de trabéculas ósseas formadas em cada grupo e período

	H ₂ O + O ₃		H ₂ O	
	N	D	N	D
7 dias	45,25	49,63	47,90	51,15
14 dias	40,68	38,89	37,21	44,65
21 dias	38,71	47,40	47,40	49,18

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.3.1 Análise Estatística de Uniformidade dos Grupos Experimentais

O teste de Uniformidade de Kolmogórov-Smírnov verificou a uniformidade dos resultados dentro dos grupos e dos períodos. Como os resultados de significância calculada estiveram acima de 5% ($p > 0,050$, significância adotada), pudemos afirmar que houve uniformidade dos valores observados dentro de cada grupo. (Tabela 5.3)

Gráfico 5.1 - Representação gráfica das médias de porcentagem de osso neoformado

Tabela 5.3 - Resultado do teste de uniformidade de Kolmogórov-Smírnov para as leituras obtidas pela histomorfometria

Períodos	Grupos	n	Significância (p)
7 dias	Grupo D H ₂ O + O ₃	4	0,459
	Grupo N H ₂ O + O ₃	4	0,490
	Grupo D H ₂ O	4	0,964
	Grupo N H ₂ O	4	0,670
14 dias	Grupo D H ₂ O + O ₃	4	0,877
	Grupo N H ₂ O + O ₃	4	0,295
	Grupo D H ₂ O	4	0,964
	Grupo N H ₂ O	4	0,840
21 dias	Grupo D H ₂ O + O ₃	3	0,893
	Grupo N H ₂ O + O ₃	4	0,959
	Grupo D H ₂ O	4	0,195
	Grupo N H ₂ O	3	0,893

Significância estatística $p \leq 0,05$

5.3.2 Análise Estatística das Variáveis de Interesse

A aplicação do teste *Mann-Whitney*, permitiu verificar possíveis diferenças na neoformação óssea com e sem a aplicação do ozônio diluído em água considerando todos os períodos de observação pós-operatórios.

Nas comparações entre os subgrupos (N H₂O+O₃) e (N H₂O), Tabela 5.4, houve diferença estatisticamente significativa no período de 21 dias, enquanto nos períodos de 7 e 14 dias esta diferença não foi observada. Nas comparações entre os subgrupos (D H₂O+O₃) e (D H₂O), Tabela 5.5; assim como nas comparações entre os subgrupos (D H₂O+O₃) + (N H₂O+O₃) e os subgrupos (D H₂O) + (N H₂O), Tabela 5.6; os resultados de significância calculada estiveram acima de 5% (0,050, significância adotada), permitindo afirmar que não houve diferença estatisticamente significativa.

A aplicação do teste de Kruskal-Wallis, entre os grupos (D H₂O+O₃; D H₂O; N H₂O+O₃ e N H₂O), Tabela 5.7, permitiu inferir que não houve diferenças

estatisticamente significantes entre os grupos experimentais e os grupos controle em nenhum dos períodos estudados.

Tabela 5.4 - Resultados do teste de Mann-Whitney para as diferenças entre as médias dos subgrupos (N H₂O+O₃) e (N H₂O) quanto aos períodos de observação de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios

Período	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
7 dias	H ₂ O+O ₃	4	45,25	4,17	41,54	49,95	0,564
	H ₂ O	4	48,18	8,24	40,51	58,84	
	Total	8	46,72	6,25	40,51	58,84	
14 dias	H ₂ O+O ₃	4	40,68	7,68	34,58	50,71	0,773
	H ₂ O	4	37,21	1,93	34,66	39,34	
	Total	8	38,95	5,51	34,58	50,71	
21 dias	H ₂ O+O ₃	4	38,71	3,89	34,02	43,45	0,034
	H ₂ O	3	48,05	1,7	46,47	49,86	
	Total	7	42,72	5,78	34,02	49,86	

Significância estatística $p \leq 0,05$

Tabela 5.5 - Resultados do teste de Mann-Whitney para as diferenças entre as médias dos subgrupos (D H₂O+O₃) e (D H₂O) quanto aos períodos de observação de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios

Período	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
7 dias	H ₂ O+O ₃	4	49,63	6,16	44,41	57,81	0,564
	H ₂ O	4	51,15	3,56	46,96	55,59	
	Total	8	50,39	4,73	44,41	57,81	
14 dias	H ₂ O+O ₃	4	38,6	2,75	35,25	41,98	0,248
	H ₂ O	4	34,8	4,28	29,64	39,69	
	Total	8	36,7	3,9	29,64	41,98	
21 dias	H ₂ O+O ₃	3	42,45	8,57	33,76	50,9	1
	H ₂ O	4	42,45	7,28	37,14	53,19	
	Total	7	42,45	7,14	33,76	53,19	

Significância estatística $p \leq 0,05$

Tabela 5.6 - Resultados do teste de Mann-Whitney para as diferenças entre as médias dos subgrupos (D H₂O+O₃) + (N H₂O+O₃) e os subgrupos (D H₂O) + (N H₂O) quanto aos períodos de observação de 7, 14 e 21 dias pós-operatórios

Período	Grupo	n	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Significância (P)
7 dias	H ₂ O+O ₃	8	47,44	5,41	41,54	57,81	0,401
	H ₂ O	8	49,67	6,09	40,51	58,84	
	Total	16	48,55	5,68	40,51	58,84	
14 dias	H ₂ O+O ₃	8	39,64	5,46	34,58	50,71	0,208
	H ₂ O	8	36	3,33	29,64	39,69	
	Total	16	37,82	4,75	29,64	50,71	
21 dias	H ₂ O+O ₃	7	40,32	6,01	33,76	50,9	0,225
	H ₂ O	7	44,85	6,04	37,14	53,19	
	Total	14	42,59	6,25	33,76	53,19	

Significância estatística $p \leq 0,05$

Tabela 5.7 - Resultados do teste de Kruskal-Wallis entre os grupos D H₂O+O₃; D H₂O; N H₂O+O₃ e N H₂O quanto aos períodos de observação de 7, 14 e 21 dias pós operatórios

	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
7 dias	N H ₂ O	4	49,63	6,16	44,41	57,81	0,362
	N H ₂ O+O ₃	4	45,25	4,17	41,54	49,95	
	D H ₂ O	4	48,18	8,24	40,51	58,84	
	D H ₂ O+O ₃	4	51,15	3,56	46,96	55,59	
	Total	16	48,55	5,68	40,51	58,84	
14 dias	N H ₂ O	4	38,6	2,75	35,25	41,98	0,54
	N H ₂ O+O ₃	4	40,68	7,68	34,58	50,71	
	D H ₂ O	4	37,21	1,93	34,66	39,34	
	D H ₂ O+O ₃	4	34,8	4,28	29,64	39,69	
	Total	16	37,82	4,75	29,64	50,71	
21 dias	N H ₂ O	3	42,45	8,57	33,76	50,9	0,351
	N H ₂ O+O ₃	4	38,71	3,89	34,02	43,45	
	D H ₂ O	3	48,05	1,7	46,47	49,86	
	D H ₂ O+O ₃	4	42,45	7,28	37,14	53,19	
	Total	14	42,59	6,25	33,76	53,19	

Significância estatística $p \leq 0,05$

6 DISCUSSÃO

A cirurgia buco maxilo facial atua no tratamento de doenças que acometem a cavidade bucal, estruturas anexas, tecidos moles e os ossos da face de pacientes que por sua vez podem apresentar alterações sistêmicas, como o diabetes, que, se não controlado, podem comprometer a reparação tecidual (Gregori; Campos, 2004).

O DM representa uma epidemia, cuja incidência expande-se acima das estimativas, e que acarreta custos extraordinários aos sistemas públicos de saúde (Wild et al., 2004; Shaw et al., 2010). Dentre as diversas complicações em consequência do DM, os pacientes diabéticos sofrem de maior risco de doenças cardiovasculares, nefropatias, retinopatias, neuropatias, osteoporose, infecções e comprometimento da reparação tecidual (Knowler et al., 2005; Yildirim et al., 2007; Räkel et al., 2008; Lu et al., 2010; Macey et al., 1989; He et al., 2004; Mainardes et al., 2007).

As doenças relacionadas ao DM são decorrentes da exposição prolongada dos tecidos às condições constantes de hiperglicemia que levam ao desequilíbrio entre a produção e o metabolismo das espécies reativas de oxigênio (Hamada et al., 2009). As espécies reativas de oxigênio são produzidas de forma intrínseca pelo organismo e são utilizadas, dentre outras funções, como mensageiros para recrutar e ordenar os diferentes tipos celulares envolvidos na inflamação e reparação dos tecidos (Fillippi, 1997; Cruz et al., 1997; Cardoso et al., 2000; Re et al., 2008).

A capacidade de interferir na produção de ROS distingue a ozonioterapia como uma técnica coadjuvante viável para auxiliar o tratamento de pacientes portadores de doenças que comprometem a reparação tecidual (Bocci, 2004^a, 2006; Re et al., 2008). Diversos autores relatam o uso do O₃ para o tratamento de diferentes doenças (Batista et al., 2001; Vigna; Menéndez-Cepero, 2007; Buliés, 1996; Buliés et al., 1997; Gent et al., 2003; Calunga et al., 2009; Agrillo et al., 2006; Martínez-Sánchez et al., 2005; Cosma et al., 2003), mas devido à sua instabilidade e aos efeitos tóxicos observados nos tecidos expostos ao gás O₃ (Pryor et al., 1995), outros veículos de aplicação mais seguros e capazes de manter a estabilidade do ozônio têm sido investigados (von Gunten, 2003; Stübinger et al., 2006).

Neste estudo a aplicação de 4ppm de ozônio diluídos em água deionizada para as irrigações de feridas ósseas realizadas em fêmures de ratos induzidos e não

induzidos ao diabetes não apresentaram efeitos tóxicos, mas não foram capazes de estimular a reparação tecidual, contrariando a nossa hipótese. A idéia de que a maior disponibilidade de oxigênio, fornecido pela irrigação com água ozonizada na realização de uma ferida óssea em um organismo comprometido sistemicamente, poderia provocar uma reação favorável ao processo de reparo não pode ser comprovada pela metodologia desta investigação. Nossos resultados são coerentes, em parte, com aqueles observados em outras pesquisas realizadas no Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilo Faciais que vêm concluindo que os efeitos da aplicação de ozônio diluído em água podem provocar uma maior redução da área de feridas dérmicas e uma contração tecidual mais regular (Traina, 2008).

O ozônio pareceu estimular o processo inflamatório nos tecidos, pois em todos os grupos submetidos à irrigação por meio de ozônio diluído em água foi notado maior infiltrado inflamatório que nos grupos controle. Está claro que como um agente oxidante este estímulo ao processo inflamatório já era esperado. Segundo Bocci (1996, 2006) o ozônio provoca no organismo uma condição oxidativa aguda, não deletéria, capaz de reverter o estado de estresse causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio.

A análise histomorfológica dos cortes histológicos mostrou que os animais não diabéticos submetidos à aplicação de água ozonizada exibiram, no período de sete dias pós-operatórios, presença de infiltrado inflamatório e extensa vascularização das feridas. Nos animais diabéticos, que receberam ozônio, em sete dias pós-operatórios, foi possível notar extenso infiltrado inflamatório e proliferação de vasos sanguíneos. Interessante que não houve nenhum caso de necrose óssea provocada pela aplicação de ozônio na concentração de 4 ppm durante os primeiros minutos da confecção da ferida. Estes resultados confirmam as observações de Cardoso et al. (2000), Bocci (2006) e Kim et al. (2009) que mencionam que o ozônio age como modulador do processo inflamatório.

De forma semelhante, nos grupos de animais diabéticos e não diabéticos submetidos ao ozônio, avaliados após quatorze dias do início da reparação tecidual, o processo hemorrágico e a neoformação vascular também foram mais evidentes. O estímulo à proliferação de vasos sanguíneos pode ser explicado pela possibilidade do ozônio em dissolver-se no plasma e reagir com antioxidantes hidrossolúveis e com ácidos lipídicos poli-insaturados disponíveis, levando à formação de água e

produtos oxidativos lipídeos. Estes produtos são responsáveis pela produção de vários compostos que atuam estimulando a angiogênese, como o óxido nítrico (Pryor et al., 1995). Comparativamente ao que já havia sido proposto por alguns autores (Kanczler, Oreffo; 2008), além dos efeitos antimicrobianos, o papel que fatores oxidantes e antioxidantes desempenham em todo o processo de resposta inflamatória, de defesa e de reparação parece estar implicado com o papel terapêutico das moléculas de ozônio no tecido lesionado.

Não foi possível observar diferenças estatisticamente significantes nas comparações entre médias obtidas com a análise histomorfométrica dos grupos de animais diabéticos e não diabéticos que foram submetidos à irrigação das feridas ósseas com água ozonizada, em nenhum dos períodos pós-operatórios observados. A comparação dos resultados entre grupos de animais diabéticos que receberam o ozônio e que não receberam o ozônio também não mostrou diferenças estatisticamente significantes.

Quando as médias das análises histomorfométricas entre os animais não diabéticos que receberam ozônio e que não receberam foram comparadas os resultados dos grupos de sete e quatorze dias não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (7 dias $p=0.564$; 14 dias $p=0,773$), porém o grupo de vinte e um dias mostrou relevância estatística ($p=0,034$) e os dados histomorfológicos comprovaram que houve um prejuízo na maturação das trabéculas ósseas neste grupo.

O ozônio parece estimular o processo inflamatório nos tecidos, pois em todos os grupos submetidos à irrigação por meio de ozônio diluído em água foi notado maior infiltrado inflamatório que nos grupos controle. Aparentemente a ação do ozônio foi momentânea e localizada. A concentração de 4ppm utilizada apesar de poder ser considerada não tóxica aos tecidos, não mostrou efeito benéfico na forma em que foi utilizada – uma irrigação isolada durante o procedimento de perfuração.

Apesar da irrelevância estatística entre as médias da quantidade de trabéculas ósseas neoformadas observadas pelo estudo histomorfométrico, a observação dos cortes histológicos dos animais diabéticos submetidos à irrigação por água ozonizada revelou que as trabéculas ósseas estavam mais maduras quando comparadas com os animais diabéticos não expostos à ozonioterapia, contrariando a nossa hipótese.

Entre os animais não diabéticos, a presença do ozônio também interferiu negativamente no processo de maturação da cortical óssea, o que pode ser comprovado estatisticamente. Esta observação vai de encontro aos resultados obtidos pelo estudo realizado por Halleen et al. (2003), em que espécies reativas de oxigênio resultantes do O₃ em contato com os fluidos orgânicos podem atuar, entre outros, estimulando a ação dos osteoclastos durante a fase de remodelação óssea.

O modelo de indução ao DM empregando a STZ para estudo do reparo ósseo em animais experimentais mostrou-se adequado, pois foi possível observar histomorfologicamente após sete dias, retardo no processo de maturação de trabéculas ósseas quando comparadas as feridas dos animais não diabéticos e induzidos ao diabetes. A realização de feridas ósseas monocorticais em fêmures de ratos foram passíveis de comparação mostrando-se um modelo eficaz de avaliação de alternativas que possam melhorar a reparação óssea em condições desfavoráveis como o DM. Quando foram analisados os animais do período experimental mais longo (21 dias) a glicemia chegou a níveis muito elevados e os animais estavam muito debilitados e o processo de reparação tecidual bastante prejudicado pela presença da doença. Estes resultados podem ser comparados aos obtidos por Follak et al. (2004) que estudou a reparação tecidual de feridas ósseas monocorticais de diferentes tamanhos, realizadas em fêmures de ratos induzidos ao DM. Assim como em nossa pesquisa, este autor também observou que mesmo sob condições hiperglicemia todas feridas mostraram neoformação de tecido ósseo.

Nos animais diabéticos os sinais clássicos do DM, como polidipsia, poliúria e polifagia, puderam ser notadas, assim como perda de peso durante a realização da higiene das gaiolas e eutanásia dos animais. Foi claramente perceptível o elevado consumo de água e alimento e o odor ácido da urina causado pela presença de corpos cetônicos derivados da síndrome metabólica. Estes sinais são descritos por diversos autores e são largamente utilizados como critérios para sugerir e orientar a realização de exames que auxiliem o diagnóstico do DM (Andreolli et al., 2002; Maraschin et al., 2010).

Foi observada a permanência do quadro inflamatório nos animais comprometidos pelo DM nos períodos de observação mais longos (14 e 21 dias), revelando o comprometimento sistêmico provocado pelo DM. Além disso, os cortes histológicos dos animais induzidos ao DM1, aos vinte e um dias pós-operatórios revelaram a substituição parcial do tecido hematopoiético por tecido gorduroso. Os

animais DM deste grupo haviam sido induzidos ao DM há mais de vinte dias e as imagens observadas ilustram alguns dos efeitos deletérios do DM observados em longo prazo. Estes resultados são comuns às observações de outros autores (Vestergaard et al., 2005; Räkel et al., 2008; Gholap et al. 2010). Liu et al. (2006) e Kayal et al. (2009) que comentam sobre as implicações do diabetes não compensado sobre os tecidos ósseos, capazes de comprometer a atividade osteoclástica.

Entre todos os animais operados foi observado apenas um caso de infecção no grupo de animais diabéticos que não recebeu a irrigação com água ozonizada, este animal não foi incluído no estudo. Mesmo sob condições de hiperglicemia média bem acima de 200 mg/dl e por longo período de diabetes (mais de 21 dias), os animais submetidos à ozonioterapia não apresentaram infecção. Sabemos da potente atividade antimicrobiana do ozônio (Bocci, 1996, 2006), mas, devido à apresentação de somente um caso de caso de infecção, em um animal que não recebeu a aplicação de água ozonizada evidencia que foram rigorosamente seguidos os protocolos de aplicação de profilaxia antibiótica e os princípios de antisepsia e esterilizações dos materiais cirúrgicos e descartáveis.

A quantidade de animais utilizados em cada grupo e período experimental está dentro da média utilizada por outros autores e permitiu que fossem realizadas as comparações necessárias (Reddy et al., 2001; Follak et al., 2004; Thrailkill et al., 2005; Tanaka et al. 2010) e permitiu que as comparações necessárias fossem realizadas. A uniformidade das amostras, confirmada pelos resultados do teste estatístico de Kolmogórov-Smírnov também permite inferir que o número de animais e leituras das amostras estava adequado.

A possível capacidade do ozônio de otimizar o processo de reparação tecidual em casos de diabetes não pode ser completamente confirmada pela metodologia empregada por esta pesquisa. Os efeitos da aplicação do ozônio sobre os tecidos puderam ser observados com maior evidência nos períodos pós-operatórios mais curtos. Acreditamos que a ação do ozônio tenha sido fugaz por se tratar da aplicação de uma dose isolada de ozônio, durante a realização da ferida experimental, a ação das espécies reativas de oxigênio pode ter ocorrido durante o período inicial da reparação tecidual, estimulando a resposta inflamatória. Outros autores relatam que a reação imediata da molécula de ozônio com fluídos orgânicos

restringe a durabilidade dos efeitos da ozonioterapia (Fillippi, 1997; Cruz et al. 1997; Cardoso et al.; 2000; Re et al., 2008).

Para esta pesquisa foi utilizada a concentração de 4ppm de ozônio diluídos em água para a irrigação das feridas ósseas monocorticais. A aplicação de diferentes concentrações de ozônio poderia trazer resultados diferentes. Traina et al. (2008) encontraram que a ação do ozônio é dependente de sua concentração e que a aplicação de 4ppm interferiu de forma positiva na reparação tecidual de feridas dérmicas. Poderia ser interessante elaborar uma nova metodologia de investigação empregando aplicações contínuas, controladas e padronizadas de ozônio na ferida durante o processo de reparo e verificar seus efeitos de forma quantitativa e objetiva.

Os efeitos estimulantes sobre a proliferação de vasos neoformados observados por este estudo, além da ausência de toxicidade e dos prováveis efeitos antimicrobianos, incentivam a realização de novas pesquisas. Estudos que possam comprovar, por meio da quantificação de proteínas relacionadas à angiogênese, os efeitos terapêuticos da ozonioterapia sobre a neoformação de vasos sanguíneos, e orientar a elaboração de protocolos terapêuticos nos tratamentos de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Além disso, outras metodologias de disponibilizar o ozônio para os tecidos poderiam apresentar resultados diferentes a longo prazo – se benéfico ou não iria depender do controle de estabilidade e de produção do ozônio.

Dentro das limitações deste estudo não foi possível estabelecer um protocolo para a aplicação terapêutica de ozônio diluído em água para tratamentos clínicos em seres humanos, mas permitiu afirmar que o ozônio interferiu nos processos de reparação tecidual, favoreceu a resposta inflamatória e estimulou a neoformação de vasos sanguíneos.

7 CONCLUSÕES

Dentro de seus limites metodológicos o estudo permitiu concluir que, a irrigação por meio de 4ppm de ozônio diluído em água, de feridas ósseas monocorticais realizadas em fêmures de ratos Wistar induzidos ou não ao diabetes:

1. Não apresentou efeitos tóxicos ou prejudiciais à reparação tecidual.
2. Melhorou a vascularização tecidual nas feridas sob o ponto de vista histomorfológico.
3. Não estimulou significativamente, sob o ponto de vista histomorfométrico, o processo de reparação tecidual em animais diabéticos.

REFERÊNCIAS¹

Advance Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Jun 12;358(24):2560-72.

Agrillo A, Petrucci MT, Tedaldi M, Mustazza MC, Marino SM, Gallucci C, Iannetti G. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. *J Craniofac Surg*. 2006 Nov;17(6):1080-3.

Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi Sh, Farhangi A, Allah Verdi A, Mofidan SMA, Lame Rad B. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem* 2007; 22: 60-4.

Andreoli, TE; Carpenter, CCJ; Griggs, RC; Loscalzo, J. In: Thomas Andreoli et al. *Cecil Medicina Interna Básica*. 5º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.533.

Avignon A, Sultan A. PKC-B inhibition: a new therapeutic approach for diabetic complications? *Diabetes Metab*. 2006 Jun;32(3):205-13.

Avogaro A, Fadini GP, Gallo A, Pagnin E, de Kreutzenberg S. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Mar;16 Suppl 1:S39-45.

Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent*. 2008 Feb;36(2):104-16.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005; 41(1): 27-51. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322005000100004&lng=en. doi: 10.1590/S1516-93322005000100004.

Batista AD, Mesa MG, Manresa CP, Cepero SM. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes diabéticos tratados com ozonoterapia: informe preliminar. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20(1):45-7.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bedi A, Fox AJ, Harris PE, Deng XH, Ying L, Warren RF, Rodeo SA. Diabetes mellitus impairs tendon-bone healing after rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg.* 2010 Oct;19(7):978-88.

Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. Review: the diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Low Extrem Wounds.* 2011 Mar;10(1):16-32.

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

Bocci, V. How Ozone acts and how it exerts therapeutic effects. In: Lynch E. *Ozone: the revolution in Dentistry.* United Kingdom: Quintessence Publishing Books; 2004a. Cap.1.1, p.15-22.

Bocci VA. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* 2004b Feb;13(1):3-11.

Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Nov 1;216(3):493-504.

Bocci VA. Why orthodox medicine has not yet taken advantage of ozone therapy. *Arch Med Res.* 2008 Feb;39(2):259-60.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005 Jun;54(6):1615-25.

Buliés JCE, Díaz OV, Rauder RS, Valdés YL, García CL. Resultados terapéuticos en la osteoartritis de la rodilla con infiltraciones de ozono. *Rev Cubana Invest Biomed* 1997;16(2):124-32.

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

Calunga JL, Trujillo Y, Menéndez S, Zamora Z, Alonso Y, Merino N, Montero T.J. Ozone oxidative post-conditioning in acute renal failure. *Pharm Pharmacol*. 2009 Feb;61(2):221-7.

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

Carvalho EM, Carvalho NAS, Ferreira LM. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cir. Bras.* [online]. 2003;18(spe):60-4. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502003001100009&lng=en. doi: 10.1590/S0102-86502003001100009.

Chatham JC, Nöt LG, Fülöp N, Marchase RB. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. *Shock*. 2008 Apr;29(4):431-40.

Chiba S, Okada K, Lee K, Segre GV, Neer RM. Molecular analysis of defect healing in rat diaphyseal bone. *J Vet Med Sci*. 2001 Jun;63(6):603-8.

Cosma F, Andreula, Luigi Simonetti, Fabio de Santis, Raffaele Agati, Renata Ricci, and Marco Leonardi. Minimally Invasive Oxygen-Ozone Therapy for Lumbar Disk Herniation. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003 May;24:996–1000.

Cruz OG, Menéndez SC, Jordán M, Jordán ME, Vázquez T. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. *Rev Cuba Estomato* 1997;34(1):21-4.

Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res*. 2007 Jun;55(6):498-510.

de Moraes JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E Jr, Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Aug;20(8):796-801.

Deboni MCZ. Antissepsia de alvéolos pós-exodontia por meio de irrigações de ozônio diluído em água [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2008.

Diniz SF, Amorim FP, Cavalcante-Neto FF, Bocca AL, Batista AC, Simm GE, Silva TA. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. *Braz J Med Biol Res.* 2008 May;41(5):373-9.

Ebensberger U, Pohl Y, Fillippi A. PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. *Dent Traumatol.* 2002 Oct;18(5):262-6.

Epari DR, Kassi JP, Schell H, Duda GN. Timely fracture-healing requires optimization of axial fixation stability. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Jul;89(7):1575-85.

Etuk EU, Muhammed BJ. Evidence Based Analysis of Chemical Method of Induction of Diabetes Mellitus in Experimental Animals. *Asian J Exp Biol Sci.* 2010;1(2):331-6.

Fillippi A. Ozone in oral surgery- current status and prospects. *Ozone Sci Eng* 1997;19:387-93.

Follak N, Klötting I, Wolf E, Merk H. Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. *Bone.* 2004 Jul;35(1):144-52.

Gent JF, Triche EW, Holford TR, Belanger K, Bracken MB, Beckett W, *et al.* Association of low-level ozone and fine particles with respiratory symptoms in children with asthma. *JAMA* 2003;290(14):1859-67.

Geraldes P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res.* 2010 Apr 30;106(8):1319-31.

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 Apr 1;88(5):873-84.

Gholap N, Davies M, Patel K, Sattar N, Khunti K. Type 2 diabetes and cardiovascular disease in South Asians. *Prim Care Diabetes.* 2010 Sep 23.

Gichner T, Velemínský J, Krepinský J. Strong mutagenic activity of streptozotocin--an antibiotic with an alkyl nitroso group. *Mol Gen Genet.* 1968;102(2):184-6.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006 Aug 8;114(6):597-605.

Gregori C, Campos AC. Reparação Tecidual. In: Gregori C, Campos AC. *Cirurgia buco-dento-alveolar*. 2o Ed. São Paulo: Sarvier, 2004, cap.XIV, p.140-58.

Grootvelt M, Baysan A, Siddiqui N, Sim J, Silwood C, Lynch E. History of clinical applications of ozone. In: Lynch E. *Ozone: the revolution in dentistry*. United Kingdom: Quintessence Publishing Books; 2004. p. 23-30.

Halleen JM, Räisänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13;274(33):22907-10.

Halleen JM, Räisänen SR, Alatalo SL, Väänänen HK. Potential function for the ROS-generating activity of TRACP. *J Bone Miner Res*. 2003 Oct;18(10):1908-11.

Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone*. 2009 Jul;45 Suppl 1:S35-8.

Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone*. 2007 May;40(5):1408-14

He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes Causes Decreased Osteoclastogenesis, Reduced Bone Formation, and Enhanced Apoptosis of Osteoblastic Cells in Bacteria Stimulated Bone Loss. *Endocrinology*. 2004 jan; 145(1):447–452.

Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, Brand K. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci*. 2006 Oct;114(5):435-40.

Hutmacher DW, Sittertinger M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2003;9 Suppl 1:S45-64.

Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008 May 2;15:100-14.

- Kayal RA, Alblowi J, McKenzie E, Krothapalli N, Silkman L, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Graves DT. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone*. 2009 Feb;44(2):357-63.
- Kietzmann T, Görlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Aug-Oct;16(4-5):474-86.
- 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 H, Streitparth F, Heller M, Kassi JP, Kandziora F, et al. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res*. 2003 Jul;21(4):662-9.
- Knowler WC, Coresh J, Elston RC, Freedman BI, Iyengar SK, Kimmel PL, Olson JM, Plaetke R, Sedor JR, Seldin MF; Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group. The Family Investigation of Nephropathy and Diabetes (FIND): design and methods. *J Diabetes Complications*. 2005 Jan-Feb;19(1):1-9.
- Kohda Y, Kanematsu M, Kono T, Terasaki F, Tanaka T. Protein O-glycosylation induces collagen expression and contributes to diabetic cardiomyopathy in rat cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci*. 2009 Dec;111(4):446-50.
- Krozer A, Hall J, Ericsson I. Chemical treatment of machined titanium surfaces. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 1999 Jun;10(3):204-11.
- Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(8):1117-24.
- Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res*. 2006 Jun;85(6):510-4.
- Liu ZJ, Velazquez OC. Hyperoxia, endothelial progenitor cell mobilization, and diabetic wound healing. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Nov;10(11):1869-82.
- López-Ibarra PJ, Pastor MM, Escobar-Jiménez F, Pardo MD, González AG, Luna JD, et al. Bone mineral density at time of clinical diagnosis of adult-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr Pract*. 2001 Sep-Oct;7(5):346-51.

Lu B, Yang Z, Wang M, Yang Z, Gong W, Yang Y, et al. High prevalence of diabetic neuropathy in population-based patients diagnosed with type 2 diabetes in the Shanghai downtown. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Jun;88(3):289-94.

Macey LR, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am*. 1989 Jun;71(5):722-33.

Mainardes KC, Viana Netto R, Donoso CPM, Kume PK, Kume KY, Busato TS. Efeito do diabetes associado ao envelhecimento na consolidação de fraturas na tíbia de ratos. *Rev Bras Ortop*. 2007;42(3):55-63.

Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S13-9.

Maraschin Jde F, Murussi N, Witter V, Silveiro SP. Diabetes Mellitus classification. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(2):40-6.

Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem*. 1991 Mar 15;266(8):4706-12.

Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol*. 2005 Oct 31;523(1-3):151-61

Melton LJ 3rd, Leibson CL, Achenbach SJ, Therneau TM, Khosla S. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J Bone Miner Res*. 2008 Aug;23(8):1334-42.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 64 p. il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos)135.

Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*. 1982 May;34(3):285-90.

Murray-Lyon IM, Eddleston AL, Williams R, Brown M, Hogbin BM, Bennett A, et al. Treatment of multiple-hormone-producing malignant islet-cell tumour with streptozotocin. *Lancet*. 1968 Oct 26;2(7574):895-8.

Musumeci G, Loreto C, Clementi G, Fiore CE, Martinez G. An in vivo experimental study on osteopenia in diabetic rats. *Acta Histochem*. 2010 Aug 7 (Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7CW7-50R63H2-1&_user=5674931&_coverDate=08%2F08%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=711e837e9dbdc5748587b454fba46e17&searchtype=a)

Nagashima M, Sakai A, Uchida S, Tanaka S, Tanaka M, Nakamura T. Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone*. 2005 Mar;36(3):502-11.

Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl*. 2000 Sep;77:S26-30.

Ogasawara A, Nakajima A, Nakajima F, Goto K, Yamazaki M. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*. 2008 Nov;43(5):832-9.

Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res*. 2005 Nov;20(11):2017-27.

Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H. Reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratos machos e fêmeas espontaneamente hipertensos: estudo histológico e histométrico. *Arq. Bras. Cardiol*. 2007 Jan; 88(1): 104-9.

Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Dec;9(6):771-9.

Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med*. 1995 Dec;19(6):935-41.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103-8.

Rajamani U, Essop MF. Hyperglycemia-mediated activation of the hexosamine biosynthetic pathway results in myocardial apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Jul;299(1):139-47.

Räkel A, Sheehy O, Rahme E, LeLorier J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2008 Jun;34(3):193-205.

Re L, Mawsouf MN, Menéndez S, Leon OS, Sánchez G, Hernández F. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res* 2008;39:17-26.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka CS. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2001 Oct;54(1):1-8.

Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005 Apr;22(4):359-70.

Riddle RC, Khatri R, Schipani E, Clemens TL. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in angiogenic-osteogenic coupling. *J Mol Med*. 2009 Jun;87(6):583-90.

Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg*. 2008 Sep;34(9):1159-69.

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

Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M. Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J*. 1992 Aug;6(11):2905-14.

Saha MT, Sievänen H, Salo MK, Tulokas S, Saha HH. Bone mass and structure in adolescents with type 1 diabetes compared to healthy peers. *Osteoporos Int*. 2009 Aug;20(8):1401-6.

Samee M, Kasugai S, Kondo H, Ohya K, Shimokawa H, Kuroda S. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Pharmacol Sci.* 2008 Sep;108(1):18-31.

Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003 Jun;52(6):1502-10.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008 Oct;19(5):459-66.

Semenza GL. Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Oct;1177:2-8.

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

Sepúlveda JR, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 2008 Oct; 52(7): 1096-1105. (Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v52n7/05.pdf>)

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater.* 2008 Apr 1;15:53-76.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Jan;87(1):4-14.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2008; 108 (1):5-13

Stübinger S, Sader R, Fillippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int.* 2006 May;37(5):353-9.

Tanaka K, Tanaka S, Sakai A, Ninomiya T, Arai Y, Nakamura T. Deficiency of vitamin A delays bone healing process in association with reduced BMP2 expression after drill-hole injury in mice. *Bone.* 2010 Dec;47(6):1006-12.

Thraill KM, Lumpkin CK Jr, Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Nov;289(5):E735-45.

Traina AA. Efeitos Biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual em feridas dérmicas em ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2008.

Traina AA, Corrêa L, Nogueira RS, Urruchi WI, Deboni MCZ. Efeito da água ozonizada na reparação tecidual de feridas em ratos: análise morfométrica. In: 24th SBPqO Annual Meeting, 2007, Atibaia. *Braz Oral Res.* 2007; 21: 162.

Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? *Injury.* 2007 Mar;38 Suppl 1:S11-25.

Van Dyke K, Jabbour N, Hoeldtke R, Van Dyke C, Van Dyke M. Oxidative/nitrosative stresses trigger type I diabetes: preventable in streptozotocin rats and detectable in human disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Aug;1203:138-45.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia.* 2005 Jul;48(7):1292-9.

Vigna I, Menéndez-Cepero S. Ozone therapy application in different ophthalmologic diseases: study of 59 cases. *RECVET.* 2007; 2(1). (Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n111107/110702.pdf>)

von Gunten U. Ozonation of drinking water: part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Res.* 2003 Apr;37(7):1443-67.

Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest.* 2007 Jun;117(6):1616-26.

Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* 2009 Oct;15(10):468-77.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004 May;27(5):1047-53.

Yildirim Z, Uçgun NI, Kiliç N, Gürsel E, Sepici-Dinçel A. Antioxidant enzymes and diabetic retinopathy. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Apr;1100:199-206.

Zoungas S, Patel A, Chalmers J, de Galan BE, Li Q, Billot L, et al. Severe hypoglycemia and risks of vascular events and death. *N Engl J Med.* 2010 Oct 7;363(15):1410-8.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO nº 04/09

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 **"Efeito do ozônio diluído em água na reparação de feridas ósseas monocorticais em fêmur de ratos Wistar normais e diabéticos"**, de responsabilidade da pesquisadora **Alexandre Viana Monteiro Frascino**, sob orientação do Professora Doutora **Maria Cristina Zindel Deboni**.

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, 02 de março de 2009.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

ANEXO B - Tabela de peso dos animais, antes da indução ao DM

ANIMAL	PESO (g)	ANIMAL	PESO (g)
A	205	ALPHA1	250
B	217	ALPHA2	250
C	211	ALPHA3	241
D	205	ALPHA4	245
E	246	ALPHA5	216
F	240	ALPHA6	214
G	249	ALPHA7	223
H	243	ALPHA8	219
I	246	ALPHA9	211
J	249	ALPHA10	225
K	250	ALPHA11	233
L	245	ALPHA12	216
M	241	BETA1	218
N	240	BETA2	204
O	239	BETA3	236
P	236	BETA4	228
Q	250	BETA5	234
R	250	BETA6	242
S	209	BETA7	224
T	250	BETA8	243
U	241	BETA9	239
V	225	BETA10	221
X	237	BETA11	250
Y	229	BETA12	229
MÉDIA 235,5417			

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
A	1	1	46,70	M	1	1	45,20	$\alpha 1$	1	1	35,30	$\beta 1$	1	1	58,00
		2	35,40			2	46,60			2	44,70			2	45,80
		3	38,30			3	54,40			3	41,20			3	71,00
		4	30,20			4	60,00			4	47,00			4	75,70
		5	15,20			5	50,40			5	49,80			5	63,00
		6	34,70			6	47,90			6	48,30			6	45,60
		7	48,60			7	54,40			7	38,10			7	47,80
		8	59,90			8	50,10			8	41,70			8	47,70
		9	37,80			9	55,20			9	48,60			9	53,90
A	2	1	51,00	M	2	1	44,10	$\alpha 1$	2	1	43,40	$\beta 1$	2	1	49,40
		2	36,00			2	46,10			2	67,60			2	43,00
		3	43,00			3	50,80			3	62,80			3	60,60
		4	40,00			4	41,20			4	61,50			4	38,80
		5	39,70			5	48,10			5	54,30			5	53,80
		6	41,80			6	44,40			6	65,70			6	51,40
		7	48,50			7	39,50			7	49,90			7	39,50
		8	40,40			8	38,00			8	58,40			8	43,90
		9	41,90			9	39,90			9	58,70			9	40,30

animal A Grupo N H₂O 7 dias
 animal M Grupo N H₂O+O₃ 7 dias
 animal $\alpha 1$ Grupo D H₂O+O₃ 7 dias
 animal $\beta 1$ Grupo D H₂O 7 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
B	1	1	55,70	N	1	1	49,70	$\alpha 2$	1	1	32,80	$\beta 2$	1	1	49,10
		2	51,70			2	48,40			2	40,30			2	50,10
		3	50,30			3	39,90			3	38,20			3	56,40
		4	55,20			4	45,50			4	55,80			4	51,00
		5	57,40			5	51,10			5	61,80			5	59,30
		6	57,60			6	45,40			6	49,90			6	57,60
		7	43,80			7	34,60			7	57,80			7	53,80
		8	42,30			8	46,70			8	55,30			8	44,80
		9	48,00			9	37,30			9	43,10			9	57,60
B	2	1	50,80	N	2	1	19,10	$\alpha 2$	2	1	30,70	$\beta 2$	2	1	55,40
		2	47,50			2	35,60			2	46,90			2	47,00
		3	47,00			3				3	40,10			3	43,70
		4	49,50			4				4	40,30			4	43,80
		5	47,10			5	40,10			5	46,80			5	50,20
		6	53,50			6	44,40			6	45,30			6	44,50
		7	49,40			7	41,40			7	40,00			7	36,70
		8	48,50			8	46,40			8	44,30			8	55,00
		9	51,10			9	50,20			9	47,50			9	51,50

animal B Grupo N H₂O 7 dias
 animal N Grupo N H₂O+O₃ 7 dias
 animal $\alpha 2$ Grupo D H₂O+O₃ 7 dias
 animal $\beta 2$ Grupo D H₂O 7 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
C	1	1	61,10	O	1	1	46,10	$\alpha 3$	1	1	58,00	$\beta 3$	1	1	38,80
		2	62,60			2	48,70			2	61,70			2	50,60
		3	53,30			3	42,40			3	51,20			3	49,70
		4	54,40			4	32,80			4	65,20			4	54,00
		5	58,00			5	40,80			5	65,20			5	54,60
		6	55,70			6	51,70			6	42,70			6	48,70
		7	58,70			7	37,90			7	58,00			7	34,30
		8	52,80			8	36,20			8	53,80			8	49,70
		9	53,50			9	52,80			9	62,80			9	41,80
C	2	1	67,90	O	2	1	45,80	$\alpha 3$	2	1	63,10	$\beta 3$	2	1	41,70
		2	58,50			2	18,50			2	63,40			2	51,20
		3	61,90			3	37,10			3	54,10			3	47,10
		4	57,50			4	50,80			4	64,30			4	54,10
		5	61,90			5	38,00			5	49,50			5	57,40
		6	65,70			6	49,00			6	59,60			6	46,10
		7	55,90			7	43,50			7	50,70			7	30,00
		8	61,60			8	38,00			8	57,20			8	52,60
		9	58,20			9	37,60			9	60,00			9	42,80

animal C	Grupo N H ₂ O	7 dias
animal O	Grupo N H ₂ O+O ₃	7 dias
animal $\alpha 3$	Grupo D H ₂ O+O ₃	7 dias
animal $\beta 3$	Grupo D H ₂ O	7 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
D	1	1	59,00	P	1	1	59,50	α 4	1	1	49,20	β 4	1	1	48,80
		2	54,00			2	49,90			2	38,20			2	53,40
		3	44,60			3				3	56,50			3	50,60
		4	44,60			4	44,70			4	54,90			4	62,20
		5	31,10			5				5	53,70			5	59,70
		6	44,50			6	49,60			6	44,00			6	53,20
		7	39,40			7	56,60			7	50,70			7	45,80
		8	40,10			8	50,70			8	51,20			8	59,30
		9	43,70			9	49,70			9	50,20			9	60,10
D	2	1	53,50	P	2	1	45,10	α 4	2	1	37,10	β 4	2	1	50,00
		2	41,40			2	35,50			2	35,00			2	55,20
		3	35,00			3				3	34,40			3	54,30
		4	44,10			4	47,80			4	42,40			4	68,20
		5	39,20			5				5	32,20			5	46,90
		6	40,00			6	46,80			6	46,60			6	62,30
		7	40,00			7	56,10			7	41,80			7	51,70
		8	34,90			8	58,70			8	41,20			8	58,10
		9	45,50			9	48,60			9	40,00			9	60,80

animal D Grupo N H₂O 7 dias
 animal P Grupo N H₂O+O₃ 7 dias
 animal α 4 Grupo D H₂O+O₃ 7 dias
 animal β 4 Grupo D H₂O 7 dias

Anexo C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
E	1	1	58,40	Q	1	1	49,80	α 5	1	1	34,80	β 5	1	1	39,50
		2	33,20			2	51,50			2	36,50			2	54,80
		3	12,50			3				3	44,70			3	38,50
		4	24,20			4	41,10			4				4	45,20
		5	22,90			5	59,90			5				5	22,80
		6				6	54,60			6				6	30,60
		7	39,50			7	53,90			7				7	32,90
		8	41,20			8	56,60			8				8	36,80
		9				9	63,50			9				9	38,10
E	2	1	52,00	Q	2	1	54,60	α 5	2	1	34,10	β 5	2	1	44,10
		2	44,00			2	43,10			2	51,70			2	44,50
		3	21,50			3	51,80			3	28,50			3	42,30
		4	26,90			4	56,50			4	22,20			4	33,40
		5	30,90			5	39,20			5	22,70			5	42,40
		6				6	41,60			6				6	44,30
		7	65,40			7	47,50			7				7	34,00
		8	50,90			8	47,00			8				8	42,90
		9				9	46,80			9				9	47,30

animal E Grupo N H₂O 14 dias
 animal Q Grupo N H₂O+O₃ 14 dias
 animal α 5 Grupo D H₂O+O₃ 14 dias
 animal β 5 Grupo D H₂O 14 dias

Anexo C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
F	1	1	45,20	R	1	1	47,70	$\alpha 6$	1	1	38,40	$\beta 6$	1	1	33,60
		2	49,70			2	43,70			2				2	35,90
		3	23,00			3	37,50			3	24,00			3	29,10
		4	27,80			4	28,40			4				4	26,90
		5	28,10			5	34,90			5				5	25,30
		6	29,20			6				6				6	47,00
		7	50,90			7	40,10			7	44,70			7	29,60
		8	59,20			8	46,10			8	49,00			8	40,00
		9	32,00			9	50,00			9	31,70			9	36,60
F	2	1	47,40	R	2	1	58,70	$\alpha 6$	2	1	55,00	$\beta 6$	2	1	33,10
		2	41,40			2	53,20			2	36,50			2	20,10
		3	19,80			3	44,00			3				3	29,10
		4	24,80			4	31,70			4				4	39,60
		5	27,70			5	43,30			5				5	30,10
		6	29,30			6	37,50			6	37,00			6	31,00
		7	50,50			7	34,00			7	55,70			7	43,00
		8	52,80			8	52,40			8	59,50			8	43,90
		9	37,90			9	44,00			9	34,70			9	28,10

animal F Grupo N H₂O 14 dias
 animal R Grupo N H₂O+O₃ 14 dias
 animal $\alpha 6$ Grupo D H₂O+O₃ 14 dias
 animal $\beta 6$ Grupo D H₂O 14 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
G	1	1	42,40	S	1	1	44,10	$\alpha 7$	1	1		$\beta 7$	1	1	40,10
		2	27,20			2	31,60			2				2	43,70
		3	47,50			3	19,60			3				3	53,40
		4	35,70			4	25,00			4				4	37,60
		5				5	21,10			5				5	31,30
		6	33,30			6	24,90			6				6	29,20
		7	42,40			7	51,20			7				7	34,50
		8	43,60			8	42,10			8	41,30			8	35,40
		9	0,00			9	31,20			9	39,00			9	31,20
G	2	1	45,70	S	2	1	51,80	$\alpha 7$	2	1		$\beta 7$	2	1	38,70
		2	39,40			2	39,10			2				2	38,10
		3				3	29,30			3				3	33,40
		4	38,90			4	32,40			4				4	34,40
		5	32,40			5	25,20			5				5	22,70
		6				6	29,00			6				6	31,70
		7	44,80			7	46,50			7				7	44,10
		8	12,80			8	45,60			8				8	39,70
		9	38,20			9	36,00			9	36,70			9	36,50

animal G Grupo N H₂O 14 dias
 animal S Grupo N H₂O+O₃ 14 dias
 animal $\alpha 7$ Grupo D H₂O+O₃ 14 dias
 animal $\beta 7$ Grupo D H₂O 14 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
H	1	1	48,50	T	1	1	46,40	$\alpha 8$	1	1	34,80	$\beta 8$	1	1	29,20
		2	39,10			2	39,70			2	39,40			2	33,50
		3	29,20			3	30,20			3	45,00			3	
		4				4	30,70			4	36,10			4	26,40
		5	38,50			5	35,80			5	31,40			5	28,80
		6	37,80			6	44,20			6	28,50			6	
		7	56,20			7	42,20			7	44,90			7	29,10
		8	47,80			8	42,60			8	46,90			8	31,10
		9				9	35,40			9	33,60			9	
H	2	1	49,40	T	2	1	44,50	$\alpha 8$	2	1	41,00	$\beta 8$	2	1	25,30
		2	25,80			2	26,60			2	35,00			2	32,80
		3	25,10			3	21,40			3	44,50			3	
		4				4	21,00			4	28,00			4	
		5	28,50			5	24,10			5	32,80			5	
		6	32,10			6	29,60			6	32,90			6	32,60
		7	45,70			7	41,50			7	42,40			7	29,90
		8	47,00			8	36,60			8	58,10			8	27,40
		9				9	29,90			9	42,20			9	

animal H Grupo N H₂O 14 dias
 animal T Grupo N H₂O+O₃ 14 dias
 animal $\alpha 8$ Grupo D H₂O+O₃ 14 dias
 animal $\beta 8$ Grupo D H₂O 14 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
I	1	1	34,20	U	1	1	34,40	$\alpha 9$	1	1	72,50	$\beta 9$	1	1	35,40
		2	16,20			2	25,60			2	40,40			2	24,20
		3	33,60			3	28,00			3				3	
		4	58,00			4	27,00			4				4	32,70
		5	54,60			5				5				5	
		6				6	42,00			6	53,90			6	45,80
		7				7	35,20			7	46,40			7	42,10
		8				8	26,90			8	61,80			8	42,70
		9				9	22,00			9	56,40			9	
I	2	1	68,50	U	2	1	49,90	$\alpha 9$	2	1	38,80	$\beta 9$	2	1	30,80
		2	51,20			2	43,90			2	43,80			2	38,40
		3	38,60			3				3	65,80			3	
		4	57,40			4				4	51,10			4	34,00
		5	52,40			5				5	38,50			5	
		6				6	49,30			6	41,30			6	46,60
		7				7	47,30			7	45,20			7	38,00
		8				8	48,10			8	44,40			8	45,30
		9				9	36,40			9	50,20			9	26,80

animal I Grupo N H₂O 21 dias
 animal U Grupo N H₂O+O₃ 21 dias
 animal $\alpha 9$ Grupo D H₂O+O₃ 21 dias
 animal $\beta 9$ Grupo D H₂O 21 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
J	1	1	57,70	V	1	1	48,50	α 10	1	1	33,50	β 10	1	1	47,00
		2	47,20			2	33,80			2	35,50			2	33,80
		3	32,00			3	33,70			3	20,00			3	35,20
		4	42,40			4				4	30,40			4	37,50
		5	42,50			5	35,20			5	27,30			5	
		6	58,00			6	34,10			6	26,40			6	
		7	71,20			7	43,40			7	38,20			7	47,70
		8	65,40			8	41,20			8	33,90			8	53,00
		9	38,30			9	32,90			9	37,40			9	36,60
J	2	1	60,50	V	2	1	37,60	α 10	2	1	40,60	β 10	2	1	45,00
		2	36,00			2				2	35,10			2	416,00
		3	34,60			3				3	33,60			3	28,90
		4	42,20			4				4	28,90			4	33,50
		5	52,40			5				5	27,00			5	
		6				6				6	36,10			6	
		7				7	44,10			7	45,30			7	44,90
		8				8	41,20			8	38,20			8	50,10
		9				9				9	40,20			9	33,60

animal J Grupo N H₂O 21 dias
 animal V Grupo N H₂O+O₃ 21 dias
 animal α 10 Grupo D H₂O+O₃ 21 dias
 animal β 10 Grupo D H₂O 21 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
K	1	1		X	1	1	48,60	α 11	1	1	68,40	β 11	1	1	63,40
		2				2	20,00			2	54,80			2	43,00
		3				3	16,00			3	40,20			3	45,70
		4				4				4	25,00			4	
		5				5				5				5	
		6				6	57,60			6	35,80			6	39,40
		7				7	47,70			7	41,10			7	60,80
		8				8	57,50			8	50,70			8	60,20
		9				9				9	36,60			9	45,30
K	2	1		X	2	1	53,60	α 11	2	1	66,30	β 11	2	1	65,00
		2				2	38,60			2	37,10			2	48,80
		3				3				3	26,10			3	49,80
		4				4				4				4	
		5				5				5				5	
		6				6	36,40			6				6	48,00
		7				7	60,80			7	42,80			7	59,70
		8				8	46,30			8	55,30			8	58,50
		9				9	38,30			9	20,40			9	57,00

animal K Grupo N H₂O 21 dias
 animal X Grupo N H₂O+O₃ 21 dias
 animal α 11 Grupo D H₂O+O₃ 21 dias
 animal β 11 Grupo D H₂O 21 dias

ANEXO C - Valores originais de todos os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica das feridas ósseas

animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso	animal	lâmina	campo	% osso
L	1	1	73,90	Y	1	1	42,90	α 12	1	1		β 12	2	1	63,50
		2	47,10			2	38,30			2				2	43,00
		3				3	19,00			3				3	
		4				4	34,30			4				4	32,10
		5	58,10			5	28,10			5				5	
		6	35,90			6	24,00			6				6	
		7	42,00			7	44,80			7				7	55,70
		8	75,60			8	47,80			8				8	36,60
		9	53,90			9	35,70			9				9	33,00
L	2	1	55,00	Y	2	1	30,70	α 12	2	1		β 12	2	1	43,20
		2	37,40			2	26,70			2				2	
		3				3	28,60			3				3	
		4				4	28,50			4				4	
		5				5	20,50			5				5	
		6	40,10			6	21,50			6				6	23,30
		7	37,20			7	45,90			7				7	40,80
		8	58,00			8	59,30			8				8	39,10
		9	39,30			9	35,80			9				9	24,20

animal L Grupo N H₂O 21 dias
 animal Y Grupo N H₂O+O₃ 21 dias
 animal α 12 Grupo D H₂O+O₃ 21 dias
 animal β 12 Grupo D H₂O 21 dias