



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA FACULDADE DE
ODONTOLOGIA**



ENZO RAPHAEL MARTINS OLIVEIRA VIEIRA NAVES

**APLICAÇÕES MÚLTIPLAS DO OZÔNIO COMO TERAPIA ADJUNTA NO
TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

UBERLÂNDI

A 2024

ENZO RAPHAEL MARTINS OLIVEIRA VIEIRA NAVES

**APLICAÇÕES MÚLTIPLAS DO OZÔNIO COMO TERAPIA ADJUNTA NO
TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito parcial
para obtenção do título de Graduado em
Odontologia

Área de Concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Suzane
Cristina Pigossi

UBERLÂNDIA

2024

ENZO RAPHAEL MARTINS OLIVEIRA VIEIRA NAVES

**APLICAÇÕES MÚLTIPLAS DO OZÔNIO COMO TERAPIA ADJUNTA NO
TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado á faculdade de odontologia da UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Odontologia.

Orientador: Prof. Dra.: Suzane Cristina Pigossi

Banca Examinadora

Uberlândia, 20 de Agosto de 2024

Prof.Dra. Suzane Cristina Pigossi (orientador)
Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia, MG

Prof.Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira (examinador)
Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia, MG

Prof.Dr. Lair Mambrini Furtado (examinador)
Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia, MG

UBERLÂNDIA

2024

Dedico esta conquista aos meus pais, José e Adelaide, que sempre se dedicaram para que eu pudesse realizar meus sonhos. Sem a educação e coragem que me proporcionaram, eu nunca teria chegado até aqui.

Minha eterna gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado da melhor forma no meu caminho. Aos meus pais que são minha fonte de determinação e persistência, e aos meus irmãos Luiz Fellipe, Maria Luiza, Lucas, Duarte e minha cunhada Raissa. Sem o amor de vocês eu não conseguiria enfrentar as dificuldades que a vida propõe.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a toda a minha família, com um agradecimento especial aos meus tios Reginaldo, Weslaine e Margarida, e aos meus primos Jean, Waleria e Alessandro. Vocês, com seus grandes corações, foram uma fonte constante de motivação e orgulho ao longo de todo o processo. Suas palavras de encorajamento e apoio foram fundamentais para minhas conquistas. Agradeço de coração por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço aos meus padrinhos Juliana e Renan, por todo cuidado que tiveram comigo e por sempre me orientarem sobre meu futuro e dificuldades que enfrentamos ao longo dos processos. Vocês são pessoas muito admiráveis e exemplo de cuidado, carinho e amor, essa trajetória ficou mais possível com o apoio de vocês.

Agradeço à minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Suzane Pigossi, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e pela imensa aprendizagem que me proporcionou. Profissionais como você são essenciais na formação de novos profissionais mais humanos e comprometidos. Também sou muito grato à Doutoranda Jovânia Alves Oliveira por sua valiosa ajuda em todas as etapas do projeto. Seus ensinamentos e competência foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Agradeço sinceramente a ambos por todo o apoio e dedicação.

Agradeço também aos meus professores, Prof^ª Dr^ª Lair Mambrini Furtado e Prof^ª Dr^ª Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira, por participarem da minha banca. É uma honra ter profissionais tão competentes e presentes durante minha graduação.

Gostaria de agradecer aos meus amigos de Goiânia, que me apoiaram durante todo esse caminho, não medindo esforços para me verem feliz. Em especial, a minha melhor amiga Mariana Veloso Tavares, que sempre acreditou em mim e me despertou o melhor que tenho. Agradeço muito a todos vocês por todo amor e dedicação com nossa amizade.

Por fim eu gostaria de agradecer aos meus pacientes, professores, e amigos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, essa trajetória não foi fácil, mas ela se tornou possível graças a cada um de vocês que agora fazem parte da minha história.

RESUMO

A terapia mecânica por meio da raspagem e alisamento radicular (RAR) é considerada padrão ouro no tratamento periodontal. No entanto, a terapia mecânica por si só pode falhar na eliminação de bactérias patogênicas localizadas nos tecidos moles e também em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais, como áreas de furca, concavidades radiculares, áreas interproximais e sítios com bolsas profundas. Assim, métodos que podem ser usados como adjuvantes à RAR têm sido propostos para promover a redução ou eliminação de patógenos periodontais e aumentar a efetividade do tratamento periodontal. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de aplicações múltiplas do ozônio como terapia adjuvante no tratamento da periodontite experimental induzida em ratos. Quarenta e oito ratos foram incluídos nesse estudo. A indução da periodontite experimental por ligadura com fio de seda foi realizada no segundo molar superior esquerdo. Após 7 dias, as ligaduras foram removidas e os animais foram alocados aleatoriamente em três tratamentos (8 animais/tratamento): Grupo RAR: RAR e irrigação com 1 ml de solução salina; Grupo CLX: RAR e irrigação com 1 ml de clorexidina (CLX) 0.2% e Grupo Ozônio: RAR e irrigação com 1 ml de água ozonizada (12µg/mL). Os protocolos adjuvantes foram realizados em 3 aplicações com intervalo de 48 horas. Os animais foram eutanasiados após 7 e 15 dias. A área de raiz exposta foi avaliada por meio de fotografias digitais nas faces vestibulares e palatinas do segundo molar superior. Para uma melhor visualização da junção cemento- esmalte as peças foram coradas com azul de metileno a 1%. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação a área de raiz exposta nas faces vestibulares e palatinas após 7 e 15 dias. Conclui-se que a aplicação múltipla de ozônio como terapia adjuvante no tratamento da periodontite experimental em ratos sem comprometimento sistêmico não resultou em uma redução significativa da área de raiz exposta quando comparada ao uso isolado da RAR ou à associação desta com a clorexidina.

Palavras-chave: Doenças Periodontais; Ozônio; Clorexidina.

ABSTRACT

Mechanical therapy through scaling and root planing (SRP) is considered the gold standard in periodontal treatment. However, mechanical therapy alone may fail to eliminate pathogenic bacteria located in soft tissues and inaccessible areas, such as furcation areas, root concavities, interproximal areas, and sites with deeper pockets. Therefore, methods that can be used as adjuncts to SRP have been proposed to promote the reduction or elimination of periodontal pathogens and enhance the effectiveness of periodontal treatment. The aim of this study was to evaluate the efficacy of multiple applications of ozone as an adjunctive therapy in the treatment of experimental periodontitis in rats. Forty-eight rats were included in the study. Experimental periodontitis was induced on the upper left second molars using silk ligatures. After 7 days, the ligatures were removed, and the animals were randomly assigned to three treatments (8 animals per treatment): SRP group - SRP with 1 ml of saline solution; CLX group - SRP with 1 ml of 0.2% chlorhexidine (CLX); and Ozone Group - SRP with 1 ml of ozonated water (12 μ g/mL). The adjunctive protocols were performed in 3 applications with a 48-hour interval. The animals were euthanized after 7 and 15 days. Bone loss was assessed through digital photographs of the buccal and palatal surfaces of the upper second molar. The samples were stained with 1% methylene blue to better visualize the cemento-enamel junction. No significant differences were found between the groups regarding bone loss on the buccal and palatal surfaces after 7 and 15 days. It was concluded that multiple applications of ozone as adjunctive therapy in the treatment of experimental periodontitis did not result in a significant reduction in bone loss compared to the use of SRP alone or its combination with chlorhexidine.

Keywords: Periodontal Diseases; Ozone; Chlorhexidine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS.....	14
5. DISCUSSÃO.....	16
6. CONCLUSÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	20
ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia.....	

1. INTRODUÇÃO

A periodontite é definida como uma doença inflamatória crônica multifatorial associada a um biofilme disbiótico, caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos periodontais de suporte. É considerada a principal causa de perda de dentes em adultos, sendo uma das maiores ameaças à saúde bucal (Benjamin, 2010; de Pablo et al., 2009). A disbiose resulta do processo de sucessão microbiana mediada pela inflamação na periodontite, em que espécies associadas à doença aparecem temporal e espacialmente na bolsa periodontal (Van Dyke et al., 2020). A resposta imune do hospedeiro e suas características genéticas afetam a gravidade da doença, assim como a virulência dos microrganismos (Lang & Bartold, 2018).

A redução de biofilmes bacterianos por meio de terapia não cirúrgica ou cirúrgica, instrução de higiene bucal com motivação do paciente e controle de agentes moduladores (por exemplo, doenças sistêmicas) são estratégias adotadas no tratamento periodontal (Moraschini et al., 2020). Tratamentos bem-sucedidos estão associados à redução dos complexos bacterianos mais virulentos (laranja e vermelho) (Socransky et al., 1998) e aumento de microrganismos compatíveis com a saúde periodontal (Colombo & Tanner, 2019). Clinicamente, ao completar a terapia periodontal inicial, um paciente com periodontite estável tratada com sucesso deve apresentar sítios com profundidade de sondagem menor ou igual a 4 mm e menos de 10% de sítios com sangramento à sondagem (Chapple et al., 2018). No entanto, bolsas residuais de 5 mm, que permanecem após o tratamento não cirúrgico, representam um fator de risco para mais perdas dentárias (Graziani et al., 2018; Matuliene et al., 2008).

Falhas na terapia mecânica estão relacionadas com a dificuldade de eliminar as bactérias patogênicas localizadas nos tecidos moles e também em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais, como áreas de furca, concavidades radiculares, áreas interproximais e sítios com bolsas profundas (Adriaens et al., 1988; Matia et al., 1986). Alguns estudos indicaram que o tratamento convencional da periodontite crônica com instrumentos manuais pode resultar em uma mudança modesta, embora transitória, na composição da flora microbiana, particularmente em bolsas profundas que persistem após a terapia periodontal (Cobb, 1996; Sherman et al., 1990). Assim, métodos que podem ser usados como adjuvantes à raspagem e

alisamento radicular (RAR) têm sido propostos para promover a redução ou eliminação de patógenos periodontais (Kaner et al., 2007; Lopes et al., 2010).

Dentre as terapias adjuvantes, a antibioticoterapia sistêmica tem sido relatada como a mais eficiente no tratamento da doença periodontal, pois leva à melhora do quadro clínico periodontal (Santos et al., 2015; Teshome & Yitayeh, 2016). No entanto, a antibioticoterapia sistêmica tem efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais, enxaqueca, tontura e alergia (Levy & Marshall, 2004). Além disso, o maior problema com a antibioticoterapia reside no potencial desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, resultando em possíveis complicações durante infecções adquiridas posteriormente (Levy & Marshall, 2004).

A terapia com ozônio é uma estratégia relativamente recente para o manejo de muitas doenças, incluindo doenças bucais, como cárie dentária e doença periodontal (Ranjith et al., 2022). As vias de administração do ozônio são tópicas e regionais para as formas gasosa e aquosa. O ozônio é um potente agente antioxidante com atividade antimicrobiana devido à liberação de espécies reativas de oxigênio. Como a maioria das bactérias relacionadas à doença periodontal são anaeróbicas, a liberação de oxidantes pode contribuir para a redução do crescimento bacteriano, aumentando a tensão de oxigênio no biofilme subgengival e danificando os componentes intracelulares. O ozônio rompe as paredes celulares microbianas em segundos, levando à lise celular imediata (Baysan et al., 2000). Ademais, as propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, imunestimulantes e imunomoduladoras do ozônio atuam modulando a resposta imune do hospedeiro na Periodontite (Tartari et al., 2020; Zeng et al., 2021).

As propriedades antibacterianas e imunomoduladoras do ozônio são propostas por muitos pesquisadores (Eick et al., 2012; Seydanur Dengizek et al., 2019; Zeng et al., 2021). No entanto, a eficácia clínica da irrigação com ozônio como adjuvante à RAR ainda é controversa. Vários estudos relataram melhora significativa na profundidade de sondagem, índice de placa, índice gengival e contagem bacteriana em quadrantes tratados com RAR juntamente com aplicação de ozônio (Hayakumo et al., 2013; Piva et al., 2020; Ranjith et al., 2022). Por outro lado, outros estudos clínicos demonstraram que o uso do ozônio adjunto à RAR não se correlaciona com uma melhora significativa na recuperação periodontal (Al Habashneh et al., 2015; Rapone et al., 2020; Seydanur Dengizek et al., 2019; Tasdemir et al., 2019).

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de aplicações múltiplas do ozônio como terapia adjuvante no tratamento da periodontite experimental induzida em ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) (ANEXO A).

Para o cálculo de amostra foi utilizado os dados de volume de tecidos mineralizados do estudo de Oliveira et al. (2016) que utilizou um modelo semelhante ao proposto nesse estudo e que avaliou o efeito do extrato de óleo insaponificável de abacate e soja sobre o reparo periodontal após remoção de ligaduras que induziram previamente a periodontite experimental. Foi verificado nesse estudo que a diferença entre as médias do volume da porcentagem de osso dentro da região de interesse (ROI) entre o grupo controle e o grupo teste foi de 12.72 com desvio padrão médio de

6.61. Dessa forma, foi determinado que o mínimo de amostra deve ser 8 animais por grupo para se obter um poder β do estudo de 0.85 e o poder α de 0.05.

Portanto, foram utilizados nesse estudo 48 ratos (*Rattus norvegicus*, variação Wistar) com 3 meses de idade, com peso entre 300-350g que foram mantidos em um ambiente com temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$), humidade (65-70%), e ciclos de luz (12 horas) controlado. Os animais foram alimentados com ração apropriada e foi oferecido água e ração ad libitum.

A distribuição dos animais de acordo com os grupos e períodos de eutanásia está apresentada na figura 1. Após a indução da periodontite experimental por 7 dias, as ligaduras foram removidas e os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de acordo com o tipo de tratamento adjuvante utilizado:

Grupo RAR: RAR e irrigação com 1 ml de solução salina

Grupo Ozônio: RAR e irrigação com 1 ml de água ozonizada (12 $\mu\text{g/mL}$)

Grupo CLX: RAR e irrigação com 1 ml de clorexidina (CLX) 0.2%

Os protocolos adjuvantes foram realizados em 3 aplicações com intervalo de 48 horas. Os animais foram eutanasiados após 7 e 15 dias.

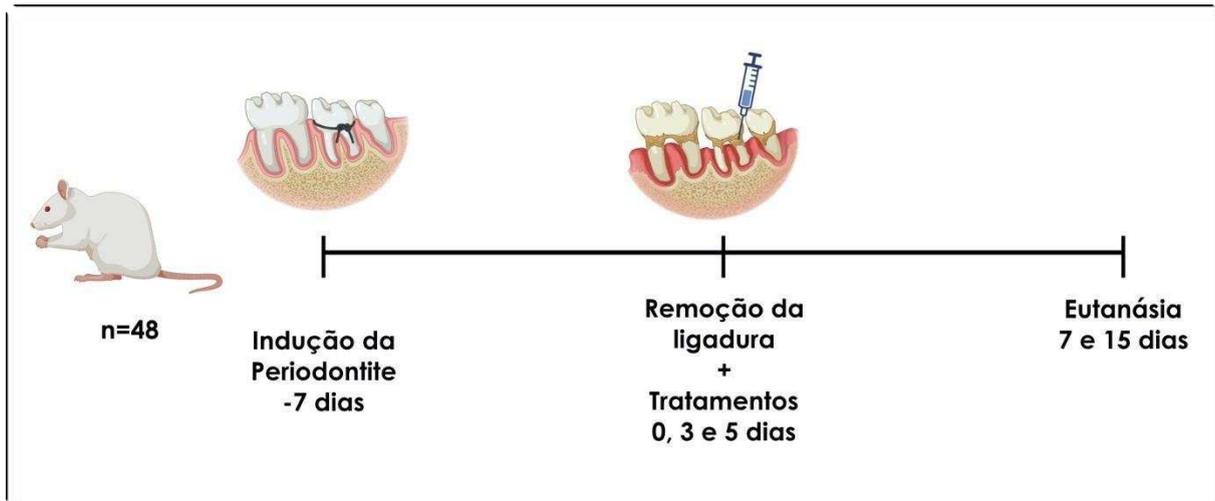


Figura 1: Desenho do estudo

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Protocolo para indução da periodontite experimental

Em todos os procedimentos (no protocolo para indução da periodontite experimental e durante a realização dos tratamentos adjuvantes), os animais foram anestesiados pela inalação de 3 Vol% de isoflurano em uma câmara por 3-5 min. Foram mantidos anestesiados em 1-1,5 Vol% de isoflurano com 0,8 L/min ar como transportador através de um cone de nariz. A periodontite experimental foi induzida no segundo molar superior esquerdo que recebeu uma ligadura feita com fio de seda

3.0 (ETHICON®, Brasil) em posição submarginal (Nociti et al., 2000). A ligadura foi removida de todos os animais após 7 dias da indução da periodontite para simular o procedimento de RAR.

3.2.2 Ozonioterapia

A água ozonizada foi preparada usando um gerador de ozônio (Philozon-Indústria e Comércio de Geradores de Ozônio, Balneário Camburiú, SC, Brasil) e imediatamente utilizada para irrigação. O equipamento foi calibrado numa concentração total de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (com concentração final de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A irrigação subgingival foi realizada com 1 mL de água ozonizada em quatro pontos (vestibular, palatina, mesial e distal) com uma agulha de ponta romba 22G acoplada a uma seringa de 10 mL.

3.2.3 CLX

A irrigação subgengival foi realizada com 1 mL de digluconato de clorexidina 0.20% (manipulado em farmácia de manipulação) em quatro pontos (vestibular, palatina, mesial e distal) com uma agulha de ponta romba 22G acoplada a uma seringa de 10 mL.

3.3 Avaliação da área de raiz exposta por meio de fotografias digitais

Nos períodos de 7 e 15 dias após o tratamento periodontal [primeira aplicação (dia 0)], os animais (n= 8 por grupo/período) foram submetidos a eutanásia por administração com sobredosagem de Cetamina (300mg/kg) e Xilazina (30mg/Kg). As maxilas foram removidas e fixadas em paraformaldeído à 4% por 48 horas e posteriormente armazenadas em Álcool 70°. Para a remoção dos tecidos moles, as maxilas foram imersas em peróxido de hidrogênio (30mg/mL; Farmax®, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil) durante 48 horas. Após esse período, os tecidos foram removidos mecanicamente com o auxílio de uma pinça. As peças foram lavadas e secas e para uma melhor visualização da junção cimento-esmalte as peças foram coradas com azul de metileno a 1% durante um minuto.

As peças foram fixadas à uma régua através de um fragmento de cera 07, de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo (Figura 2). Foram realizadas fotografias das faces vestibular e palatina de cada uma das hemimaxilas utilizando uma câmera fotográfica digital modelo EOS Rebel T3i (Canon®) com lente macro 100 posicionada em uma superfície de modo que o cone ficasse o mais paralelo possível em relação ao solo.

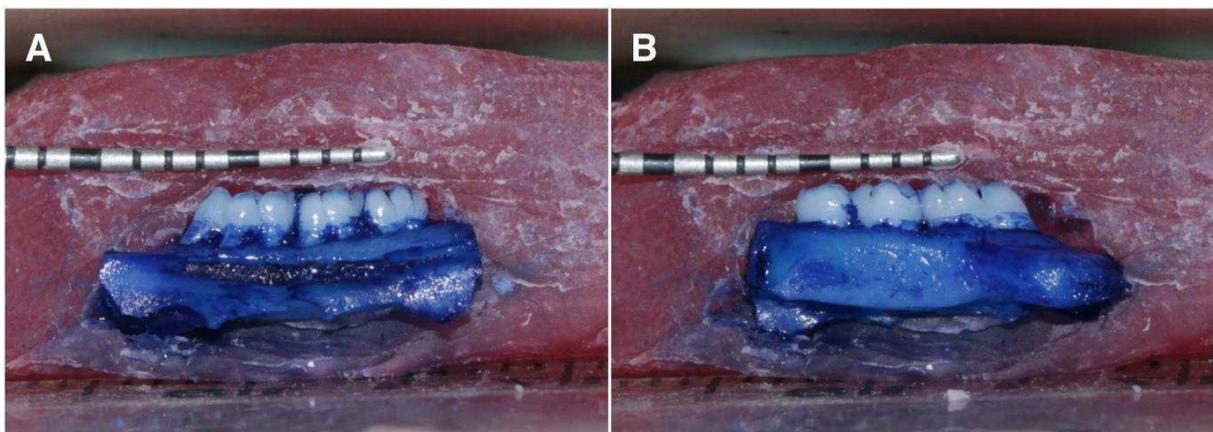


Figura 2: Peças fixadas para realização das fotografias digitais. A: Face vestibular; B: Face palatina.

Um examinador, calibrado e cego (E.R.M.O.V.N.) aos grupos experimentais, calculou a área de raiz exposta por meio da identificação da junção cimento-esmalte e da crista óssea nas faces vestibular e palatina do segundo molar superior (onde foi instalada a ligadura) utilizando o software Image J (Bethesda, USA) (Figura 3). Uma sonda periodontal milimetrada (Sonda milimetrada Carolina do Norte nº 15, HuFriedy, Chicago, Estados Unidos) foi utilizada para calibração das medidas no software (Figura 3).

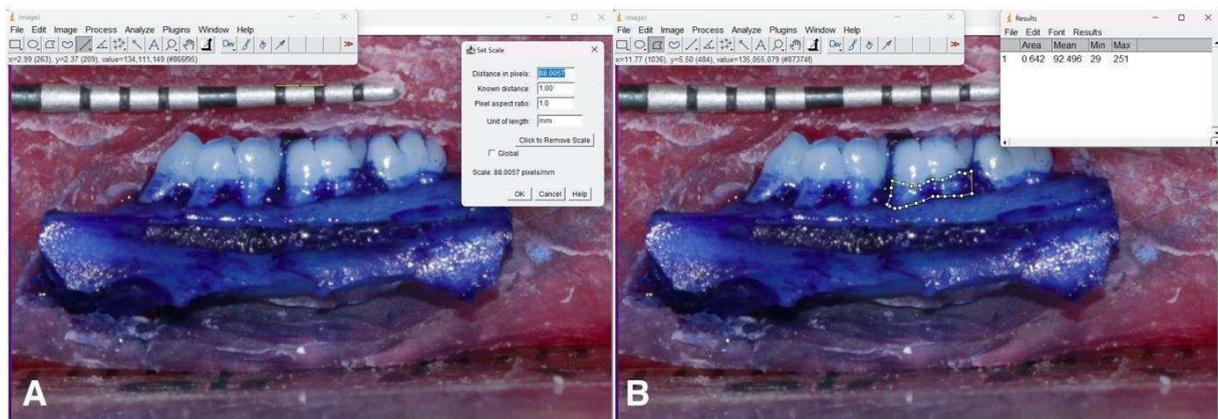


Figura 3: Análise da área de raiz exposta utilizando o software Image J. A: Calibração da distância em pixel para milímetros utilizando uma sonda periodontal. B: Medida da área de raiz exposta na face vestibular.

3.4 Análise estatística

O teste de normalidade Shapiro-Wilk confirmou que os dados numéricos se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central e testes paramétricos foram utilizados para análise inferencial dos dados. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA multifatorial complementado pelo teste de Tukey e para comparação entre os períodos foi utilizado o teste t pareado. Todos os testes foram aplicados com um nível de significância de 5%. O software GraphPad Prism 9.5 (San Diego, USA) foi utilizado para realização da análise estatística.

4. RESULTADOS

Para todos os grupos e períodos experimentais as ligaduras permaneceram em posição durante os 7 dias necessários para indução da periodontite experimental. Não foram observadas reações adversas ou sinais de sofrimento nos animais após os tratamentos e não houve perda de animais durante o protocolo experimental.

Na figura 4 encontra-se os resultados obtidos na avaliação da área de raiz exposta obtida em cada grupo em que os gráficos A e B indicam a área de raiz exposta medida na face vestibular (Figura 4A) e palatina (Figura 4B) após 7 dias e os gráficos C e D representam a área de raiz exposta vestibular (Figura 4C) e palatina (Figura 4D) após 15 dias da remoção da ligadura.

Em relação ao período experimental de 7 dias, tanto na face vestibular como na face palatina, observou-se uma menor área de raiz exposta para o grupo Ozônio seguido do grupo RAR e grupo CLX, porém sem diferenças significativas entre os grupos (Figura 4). Após 15 dias, apesar de sem diferenças significativas, o grupo RAR apresentou menor área de raiz exposta, seguido do grupo ozônio e do grupo CLX na face vestibular (Figura 4). Na face palatina, todos os grupos apresentaram área de raiz exposta semelhante sem diferença significativa após 15 dias.

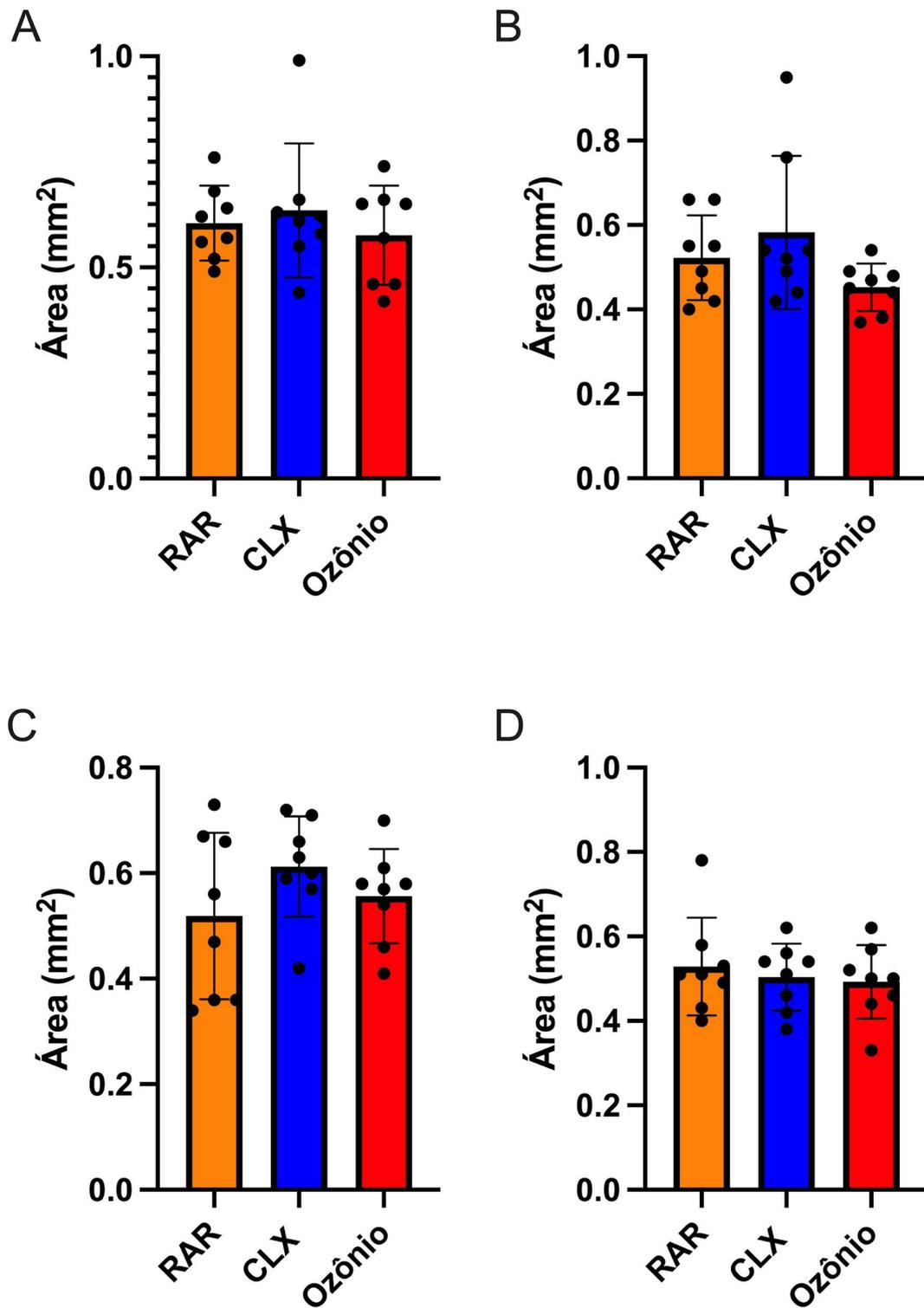


Figura 4: Área de raiz exposta avaliada por meio de fotografias digitais para os grupos RAR, CLX e Ozônio. A: Face vestibular após 7 dias; B: Face palatina após 7 dias; C: Face vestibular após 15 dias e D: Face vestibular após 15 dias.

5. DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença inflamatória destrutiva que envolve interações entre os sistemas inflamatório e imunológico. Embora a inflamação periodontal seja iniciada por componentes do biofilme subgingival, a produção e liberação de agentes inflamatórios gerados e controlados pela resposta do hospedeiro aos microrganismos são, em grande parte, responsáveis pelo colapso periodontal (Theodoro et al., 2015). O modelo experimental de indução da doença periodontal com ligadura utilizado nesse estudo favorece o acúmulo de biofilme, induzindo um processo inflamatório local que depende não apenas do biofilme, mas também da resposta imunológica do hospedeiro (De Almeida et al., 2015). Por essas características, esse modelo tem sido amplamente utilizado para avaliar diferentes protocolos de tratamento da doença periodontal, pois mimetiza o processo destrutivo no ligamento periodontal e a reabsorção do osso alveolar induzidos pelo biofilme que são característicos da periodontite. Após 7 dias de indução da periodontite, as suturas foram removidas em todos os grupos no presente estudo e o acúmulo de biofilme foi eliminado, simulando o procedimento de RAR.

Clinicamente, há evidências de que a RAR é eficaz no tratamento da doença periodontal. No entanto, a eficácia desses tratamentos é limitada em certas condições clínicas, como em áreas com bifurcações ou trifurcações radiculares e em sulcos radiculares (Theodoro et al., 2015). Além disso, um efeito adverso da terapia periodontal mecânica é o dano irreversível ao cimento e à dentina (Zappa et al., 1991), especialmente quando são necessárias instrumentações repetidas para tratar bolsas residuais, levando ao conseqüente acúmulo de trauma tecidual. Para superar esses problemas, o ozônio, que contém três átomos de oxigênio, tem sido proposto como terapia adjuvante à RAR pois exibe efeitos antimicrobianos, anti-hipóxicos e analgésicos (Saglam et al., 2020). É capaz de destruir as paredes celulares microbianas em segundos, levando à lise celular imediata (Baysan et al., 2000). Além disso, melhora o sistema imunológico, ativa mecanismos bioquímicos e estimula o sistema antioxidante sobre o componente da resposta do hospedeiro na patogênese periodontal (Bayer Alinca et al., 2020).

No presente estudo menor área de raiz exposta foi observada no grupo ozônio, principalmente no período de 7 dias, porém sem diferença significativa entre os grupos. De maneira semelhante, Saglam et al. (2020) avaliou o efeito da aplicação

sistêmica ou tópica de ozônio (por duas semanas com intervalo de 2 dias) na perda óssea alveolar em um modelo de periodontite em ratos. A expressão do fator indutível por hipóxia-1 alfa (HIF-1- α) e do ligante ativador do receptor NF- κ B (RANKL) também foi avaliada por meio de análise imuno-histoquímica. Ambas as aplicações de ozônio reduziram a contagem de células positivas para RANKL. A aplicação tópica reduziu a contagem de células positivas para HIF-1- α , e a aplicação sistêmica foi encontrada como mais eficaz na redução da perda óssea alveolar (avaliada por meio de análise histomorfométrica) em comparação com o grupo controle.

Ao comparar a aplicação tópica de ozônio e do laser de baixa intensidade (LBI) aplicados por duas semanas com intervalo de 2 dias em um modelo de periodontite em ratos, Bayer Alinca et al. (2020) observou que a perda óssea alveolar foi significativamente menor no grupo LBI em comparação com o grupo controle. Nenhuma diferença significativa na perda óssea alveolar foi encontrada entre o grupo ozônio e os outros grupos. O número de células positivas para HIF-1 α foi significativamente menor no grupo LBI em comparação com o grupo controle. Menos células positivas para RANKL no grupo ozônio foram encontradas em comparação com o grupo controle. O número de células positivas para osteoprotegerina (OPG) foi significativamente maior no grupo LBI do que no grupo controle. Ademais, o estudo mostrou que, embora ambos os tratamentos tenham produzido efeitos positivos, a LBI pareceu ser mais eficaz para aumentar a formação óssea alveolar.

A CLX é um agente antimicrobiano com amplo espectro de atividade (Prietto et al., 2020). Esse bis-biguanídeo catiônico reduz a proliferação do biofilme dental, sendo o mais frequentemente estudado para irrigação subgengival durante a RAR (Greenstein et al., 2005). Por essa razão, a CLX foi utilizada neste estudo como parâmetro de comparação para avaliar a eficácia da ozonioterapia. Além dos seus efeitos antimicrobianos comprovados, apresenta como vantagens sua disponibilidade, baixo custo, segurança, eficácia, substantividade e baixa toxicidade (de Freitas et al., 2016). A CLX apresenta atividade proteolítica contra certos patógenos periodontais (Grenier, 1993) e capacidade antioxidante (Firatli et al., 1994) por meio da inibição da geração de ânions superóxidos em células vermelhas e brancas do sangue (Gabler et al., 1987). Estudos clínicos demonstraram que o uso da CLX é eficaz na redução da inflamação periodontal e no controle do biofilme subgengival, sendo também efetiva na periodontite, melhorando os parâmetros clínicos periodontais avaliados (da Costa et al., 2017).

No entanto, o uso da CLX a 0,20% não resultou em uma redução da área de raiz exposta superior à observada nos outros grupos no presente estudo. O mesmo foi observado no estudo de de Freitas et al. (2016) em que a análise histomorfométrica não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado com RAR e os grupos tratados com irrigação subgengival com diversas soluções [solução salina (0,9%), clorexidina (0,2%), hipoclorito de sódio (0,1% e 0,5%) e extrato de própolis (11%)] em relação ao suporte ósseo e à migração epitelial. Todavia, Prietto et al. (2020) observou que os grupos tratados com irrigação subgengival com CLX a 0,12% ou 0,2% imediatamente após RAR apresentaram menos inflamação e melhoraram o reparo tecidual ao longo de todo o experimento quando comparados ao grupo apenas com RAR. Na análise histomorfométrica aos 7, 15 e 30 dias, o grupo apenas com RAR apresentou uma perda óssea estatisticamente maior do que os grupos RAR+0,12% CHX e RAR+0,2% CHX. Ambas as concentrações de clorexidina modulam a expressão de fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP), RANKL e OPG.

Os achados do presente estudo podem ser explicados pela principal limitação da terapia de irrigação, que é a rápida eliminação dos medicamentos aplicados subgengivalmente. Essa rápida eliminação parece reduzir a substantividade dos agentes e conseqüentemente sua eficácia (Greenstein et al., 2005). No entanto é importante ressaltar que a análise área de raiz exposta por fotografias digitais realizada no presente estudo apresenta resultados preliminares e limitados, visto que apenas as faces vestibulares e palatinas foram avaliadas. Nas próximas etapas deste estudo, uma avaliação mais detalhada da perda óssea será conduzida por meio de análise microtomográfica. Além disso, o processo de reparo dos tecidos periodontais será investigado através de análises histológicas e de expressão gênica.

6. CONCLUSÃO

Considerando as limitações deste estudo, conclui-se que a aplicação múltipla de ozônio como terapia adjuvante no tratamento da periodontite experimental não resultou em uma redução significativa da área de raiz exposta quando comparada ao uso isolado da RAR ou à associação desta com a clorexidina.

REFERÊNCIAS

Adriaens, P. A., Edwards, C. A., De Boever, J. A., & Loesche, W. J. (1988). Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol*, 59(8), 493-503. <https://doi.org/10.1902/jop.1988.59.8.493>

Al Habashneh, R., Alsalman, W., & Khader, Y. (2015). Ozone as an adjunct to conventional nonsurgical therapy in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontal Res*, 50(1), 37-43. <https://doi.org/10.1111/jre.12177>

Bayer Alinca, S., Saglam, E., Zengin Celik, T., Hacisalihoglu, P., & Dogan, M. A. (2020). Is low level laser therapy or ozone therapy more effective for bone healing? Understanding the mechanisms of HIF-1alpha, RANKL and OPG. *Biotech Histochem*, 95(8), 597-604. <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1743360>

Baysan, A., Whiley, R. A., & Lynch, E. (2000). Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res*, 34(6), 498-501. <https://doi.org/10.1159/000016630>

Benjamin, R. M. (2010). Oral health: the silent epidemic. *Public Health Rep*, 125(2), 158-159. <https://doi.org/10.1177/003335491012500202>

Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., . . . Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S74-s84. <https://doi.org/10.1002/jper.17-0719>

Cobb, C. M. (1996). Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol*, 1(1), 443-490. <https://doi.org/10.1902/annals.1996.1.1.443>

Colombo, A. P. V., & Tanner, A. C. R. (2019). The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective. *J Dent Res*, 98(4), 373-385. <https://doi.org/10.1177/0022034519830686>

da Costa, L., Amaral, C., Barbirato, D. D. S., Leao, A. T. T., & Fogacci, M. F. (2017). Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc*, 148(5), 308-318. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2017.01.021>

De Almeida, J., Ervolino, E., Bonfietti, L. H., Novaes, V. C., Theodoro, L. H., Fernandes, L. A., Martins, T. M., Faleiros, P. L., & Garcia, V. G. (2015). Adjuvant Therapy With Sodium Alendronate for the Treatment of Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*, 86(10), 1166-1175. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150166>

de Freitas, C. V., Galdez, L. P., Dias, H. L., Cirelli, J. A., Souza, E. M., & da Silva, V. C. (2016). Effect of Subgingival Irrigation with Different Substances in the Treatment of Periodontal Disease. A Histometric Study in Rats. *J Int Acad Periodontol*, 18(1), 2-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26764965>

de Pablo, P., Chapple, I. L., Buckley, C. D., & Dietrich, T. (2009). Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 5(4), 218-224. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.28>

Eick, S., Tigan, M., & Sculean, A. (2012). Effect of ozone on periodontopathogenic species--an in vitro study. *Clin Oral Investig*, 16(2), 537-544. <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0515-1>

Firatli, E., Unal, T., Onan, U., & Sandalli, P. (1994). Antioxidative activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. *J Clin Periodontol*, 21(10), 680-683. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1994.tb00786.x>

Gabler, W. L., Bullock, W. W., & Creamer, H. R. (1987). The influence of chlorhexidine on superoxide generation by induced human neutrophils. *J Periodontal Res*, 22(6), 445-450. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1987.tb02053.x>

Graziani, F., Karapetsa, D., Mardas, N., Leow, N., & Donos, N. (2018). Surgical treatment of the residual periodontal pocket. *Periodontol 2000*, 76(1), 150-163. <https://doi.org/10.1111/prd.12156>

Greenstein, G., Research, S., & Therapy Committee of the American Academy of, P. (2005). Position paper: The role of supra- and subgingival irrigation in the treatment of periodontal diseases. *J Periodontol*, 76(11), 2015-2027. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11.2015>

Grenier, D. (1993). Reduction of proteolytic degradation by chlorhexidine. *J Dent Res*, 72(3), 630-633. <https://doi.org/10.1177/00220345930720031301>

Hayakumo, S., Arakawa, S., Mano, Y., & Izumi, Y. (2013). Clinical and microbiological effects of ozone nano-bubble water irrigation as an adjunct to mechanical subgingival debridement in periodontitis patients in a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig*, 17(2), 379-388. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0711-7>

Kaner, D., Bernimoulin, J. P., Hopfenmüller, W., Kleber, B. M., & Friedmann, A. (2007). Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 34(10), 880-891. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01122.x>

Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal health. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S9-S16. <https://doi.org/10.1002/jper.16-0517>

Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*, 10(12 Suppl), S122-129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>

Lopes, B. M., Theodoro, L. H., Melo, R. F., Thompson, G. M., & Marcantonio, R. A. (2010). Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with erbium:YAG laser and scaling and root planing. *J Periodontol*, 81(5), 682-691. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.090300>

Matia, J. I., Bissada, N. F., Maybury, J. E., & Ricchetti, P. (1986). Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 6(6), 24-35.

Matuliene, G., Pjetursson, B. E., Salvi, G. E., Schmidlin, K., Brägger, U., Zwahlen, M., & Lang, N. P. (2008). Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol*, 35(8), 685-695. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01245.x>

Moraschini, V., Kischinhevsky, I. C. C., Calasans-Maia, M. D., Shibli, J. A., Sartoretto, S. C., Figueredo, C. M., & Granjeiro, J. M. (2020). Ineffectiveness of ozone therapy in nonsurgical periodontal treatment: a systematic review and metaanalysis of randomized clinical trials. *Clin Oral Investig*, 24(6), 1877-1888. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03289-2>

Nociti, F. H., Jr., Nogueira-Filho, G. R., Primo, M. T., Machado, M. A., Tramontina, V. A., Barros, S. P., & Sallum, E. A. (2000). The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol*, 71(9), 1460-1464. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.9.1460>

Oliveira, G. J., Paula, L. G., Souza, J. A., Spin-Neto, R., Stavropoulos, A., & Marcantonio, R. A. (2016). Effect of avocado/soybean unsaponifiables on ligature-induced bone loss and bone repair after ligature removal in rats. *J Periodontol Res*, 51(3), 332-341. <https://doi.org/10.1111/jre.12312>

Piva, A., Avantaggiato, P., Candotto, V., Pellati, A., & Moreo, G. (2020). The use of ozone therapy for treatment of periodontal disease: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial. *J Biol Regul Homeost Agents*, 34(3 Suppl. 1), 91-98. Dental supplement.

Prietto, N. R., Martins, T. M., Santinoni, C. D. S., Pola, N. M., Ervolino, E., Bielemann, A. M., & Leite, F. R. M. (2020). Treatment of experimental periodontitis with chlorhexidine as adjuvant to scaling and root planing. *Arch Oral Biol*, 110, 104600. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104600>

Ranjith, A., Niranjana, J. M., & Baiju, K. V. (2022). Adjunctive benefit of ozonized water irrigation with mechanical debridement in the management of Stage III periodontitis: A

randomized controlled clinical and biochemical study. *Int J Dent Hyg*, 20(2), 364-370. <https://doi.org/10.1111/idh.12547>

Rapone, B., Ferrara, E., Corsalini, M., Converti, I., Grassi, F. R., Santacroce, L., Topi, S., Gnoni, A., Scacco, S., Scarano, A., & Delvecchio, M. (2020). The Effect of Gaseous Ozone Therapy in Conjunction with Periodontal Treatment on Glycated Hemoglobin Level in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus: An Unmasked Randomized Controlled Trial. *Int J Environ Res Public Health*, 17(15). <https://doi.org/10.3390/ijerph17155467>

Saglam, E., Alinca, S. B., Celik, T. Z., Hacisalihoglu, U. P., & Dogan, M. A. (2020). Evaluation of the effect of topical and systemic ozone application in periodontitis: an experimental study in rats. *J Appl Oral Sci*, 28, e20190140. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0140>

Santos, C. M., Lira-Junior, R., Fischer, R. G., Santos, A. P., & Oliveira, B. H. (2015). Systemic Antibiotics in Periodontal Treatment of Diabetic Patients: A Systematic Review. *PLoS One*, 10(12), e0145262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145262>

Seydanur Dengizek, E., Serkan, D., Abubekir, E., Aysun Bay, K., Onder, O., & Arife, C. (2019). Evaluating clinical and laboratory effects of ozone in non-surgical periodontal treatment: a randomized controlled trial. *J Appl Oral Sci*, 27, e20180108. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0108>

Sherman, P. R., Hutchens, L. H., Jr., Jewson, L. G., Moriarty, J. M., Greco, G. W., & McFall, W. T., Jr. (1990). The effectiveness of subgingival scaling and root planning. I. Clinical detection of residual calculus. *J Periodontol*, 61(1), 3-8. <https://doi.org/10.1902/jop.1990.61.1.3>

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2), 134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>

Tartari, A. P. S., Moreira, F. F., Pereira, M., Carraro, E., Cidral-Filho, F. J., Salgado, A. I., & Kerppers, II. (2020). Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*, 43(3), 985-993. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01184-2>

Tasdemir, Z., Oskaybas, M. N., Alkan, A. B., & Cakmak, O. (2019). The effects of ozone therapy on periodontal therapy: A randomized placebo-controlled clinical trial. *Oral Dis*, 25(4), 1195-1202. <https://doi.org/10.1111/odi.13060>

Teshome, A., & Yitayeh, A. (2016). The effect of periodontal therapy on glycemic control and fasting plasma glucose level in type 2 diabetic patients: systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*, 17(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0249-1>

Theodoro, L. H., Caiado, R. C., Longo, M., Novaes, V. C., Zanini, N. A., Ervolino, E., de Almeida, J. M., & Garcia, V. G. (2015). Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci*, 30(4), 1209-1218. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1575-7>

Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., & Reynolds, E. C. (2020). The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. *Front Immunol*, 11, 511. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00511>

Zappa, U., Smith, B., Simona, C., Graf, H., Case, D., & Kim, W. (1991). Root substance removal by scaling and root planing. *J Periodontol*, 62(12), 750-754. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.12.750>

Zeng, J., Tang, Z., Zhang, Y., Tong, X., Dou, J., Gao, L., Ding, S., & Lu, J. (2021). Ozonated autohemotherapy elevates PPAR- γ expression in CD4(+) T cells and serum HDL-C levels, a potential immunomodulatory mechanism for treatment of psoriasis. *Am J Transl Res*, 13(1), 349-359.

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia

SEI/UFU - 5164178 - Certificado

2/6/24 9:06 AM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Reitoria
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais
Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 02 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8658 - www.comissoes.propf.ufu.br/ceua - ceua@propf.ufu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Eficácia da terapia fotodinâmica e do ozônio como terapias adjuvantes no tratamento da periodontite experimental”, protocolo nº 23117.074411/2023-24, sob a responsabilidade de Suzane Cristina Pigossi – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 02 de fevereiro de 2024.

(We certify that the project entitled “Eficácia da terapia fotodinâmica e do ozônio como terapias adjuvantes no tratamento da periodontite experimental” protocol 23117.074411/2023-24, under the responsibility of Suzane Cristina Pigossi - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of February 02th, 2024).

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Vigência do Projeto:	Início: 28/03/2024	Término: 05/12/2026
Espécie/Linhagem/Grupos Taxionômicos:	Rato Heterogênico Wistar	
Número de Animais:	540 animais	
Peso / Idade:	250 - 300g/ 3 meses	
Sexo:	Macho	
Origem / Local:	REBIR - UFU	
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU	

Uberlândia, 06 de fevereiro de 2024.

LUIZ FERNANDO MOREIRA IZIDORO
Coordenador da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Portaria R Nº 4028/2023



Documento assinado eletronicamente por Luiz Fernando Moreira Izidoro, Coordenador(a), em 06/02/2024, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 5164178 e o código CRC CBC26B49.