



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

GUILHERME ASSUMPÇÃO SILVA

**Influência da ozônioterapia sistêmica no processo de reparo
periodontal de dentes submetidos ao reimplante**

**Araçatuba
2024**

GUILHERME ASSUMPÇÃO SILVA

**Influência da ozônioterapia sistêmica no processo de reparo
periodontal de dentes submetidos ao reimplante**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista (Unesp), como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Atili
Brandini de Weert

**Araçatuba
2024**

Aos meus pais, Renata Assumpção e Daniel Musa e Silva, dedico este trabalho por toda a educação, amor e confiança que me deram. Obrigado por me tornarem um ser humano capaz de amar e por estarem comigo nessa trajetória, vocês eu não estaria aqui.

Ao meu irmão, Zion Assumpção Musa, por estar ao meu lado sempre e ser meu companheiro de vida .

À minha família, aos meus amigos e professores que estiveram ao meu lado e contribuíram efetivamente para que eu chegasse até esse momento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, à quem devo minha existência e gratidão por estar ao meu lado em todos os momentos em que passei, ter me guiado em todos eles e por ter me abençoado durante todos esses anos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do vice-diretor Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra.

À Professora Daniela Atili Brandini de Weert, a qual me acolheu no meu segundo ano de graduação e eu criei uma admiração imensa pela profissional, mulher e mãe que ela é. Obrigado por me ensinar tanto não apenas sobre minha futura profissão, mas também como me tornar um ser humano melhor e a confiar em mim e no meu trabalho.

Ao Professor Juliano Milanezi de Almeida, o qual me identifiquei logo quando nos conhecemos e me recebeu tão bem não só na disciplina de periodontia como nas conversas na clínica e quando precisei da sua ajuda, além de contribuir para eu estar no mestrado e por grande parte do meu aprendizado.

Ao doutorando Otávio Augusto Pacheco Vitória, por ter aceitado fazer parte da minha banca, por estar sempre disposto a me ajudar e ensinar. Acredito que nós temos longos anos pela frente.

À doutoranda Juliana Goto e ao Lourenço Canevari, sem o ensinamento e auxílio deles a dificuldade para executar o trabalho seria maior.

Aos professores da disciplina de Clínica Integrada, Celso Koogi Sonoda e Aline Satie Takamyia pela contribuição durante a pesquisa e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos meus pais, as principais pessoas da minha vida, sem eles eu não teria chego onde estou e onde ainda vou chegar. Obrigado por se dedicarem à nossa família, todo esse amor e respeito são essenciais na minha vida.

Ao meu irmão, uma das pessoas que mais amo na vida e vou cuidar pra sempre independente do que aconteça.

À Natalia Saori Izumi, quem eu comecei a morar junto no segundo ano da graduação e nosso encontro foi de almas. Obrigado por ter me convidado para morar com você, isso foi o início dessa irmandade que criamos e irei levar ela para sempre, e também por puxar minha orelha na hora que precisa. Meu amor por você é gigante.

À Barbara Penatti, quem eu me aproximei nos primeiros dias de aula e se tornou umas das principais pessoas da minha vida. Obrigado por todos esses momentos vividos, pelo amor e respeito que criamos um pelo outro e por estar comigo sempre. Sem você não seria tão especial ter chego aqui.

À Mileni Buzo, minha companheira de risadas, comida e dupla de cirurgia. Obrigado por ser tão especial e por estar sempre presente. Com certeza ter pessoas como você na vida é um privilégio e eu tenho essa felicidade, sua presença é essencial pra mim.

Aos meus amigos feitos aqui durante esses anos que contribuíram para a vida ser mais divertida e eu não me sentir sozinho ao estar longe da minha família e sempre ao meu lado em momentos importantes. Obrigado Gabriele, Ana Vitória, João, Julia Maria, Rodrigo, Vitor, César, Gabriela, Mariana, Dafiny, Rafaela, Janaína, Caio e Izabela.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Paulo, Marco e Renato pela contribuição na realização deste trabalho.

À todos os professores e funcionários da faculdade, cada um da sua forma é responsável pela minha formação.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, pela concessão da bolsa de iniciação científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

“Viver não é se encontrar, viver é se criar.”

SOLOMON, A.

SILVA GA. Influência da ozonioterapia sistêmica no processo de reparo periodontal de dentes submetidos ao reimplante [trabalho de conclusão de curso]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2024.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da administração sistêmica do gás ozônio no processo de reparo periodontal de dentes de ratos submetidos ao reimplante imediato e tardio. Oitenta ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: RI-reimplante imediato (n=20), RT-reimplante tardio (n=20), RIO-reimplante imediato e ozonioterapia (n=20), e RTO-reimplante tardio e ozonioterapia (n=20), avaliados nos períodos experimentais de 15 e 45 dias. Antes do reimplante imediato os dentes foram extraídos e armazenados em meio seco durante 5 minutos; e antes do reimplante tardio os dentes extraídos foram armazenados em soro fisiológico durante 30 minutos. Para ozonioterapia aplicou-se 3 ml de gás ozônio, via retal, em uma concentração de 10ug/ml, 2 vezes por semana. Após os períodos experimentais, os ratos foram eutanasiados para as suas hemi-maxilas direitas serem coletadas e processadas para serem feitas as análises quantitativas e qualitativas. No reimplante imediato, a largura do ligamento periodontal se manteve semelhante em todos os grupos aos 15 e 45 dias de avaliação, com uma porcentagem de fibras colágenas de birrefringência verde e vermelha semelhante ao controle, contudo com um aumento do perímetro das fibras de birrefringência vermelha aos 15 dias ($p=0,06$). Aos 45 dias foi observado uma redução na presença de anquilose no grupo RIO ($p=0,05$). Já nos grupos de dentes submetidos ao reimplante tardio, a largura do ligamento periodontal apresentou uma redução aos 15 dias ($p=0,003$) e normalização da espessura aos 45 dias, com tendência a redução das fibras colágenas de birrefringência verde em ambos os períodos estudados, como resultado de maturação do ligamento periodontal para garantir a estabilidade dentária ou possível inibição do *turnover* celular. Aos 15 dias, o grupo RTO mostrou uma maior extensão e profundidade de reabsorção, bem como anquilose, quando comparado ao seu respectivo controle; com inversão significativa deste comportamento aos 45 dias ($p=0,01$ e $p=0,03$).

Palavras-chave: Avulsão dentária. Reimplante dentário. Ozonioterapia. Reabsorção dentária. Processo de reparo.

SILVA GA. Influence of systemic ozone therapy on the periodontal repair process of teeth undergoing reimplantation [trabalho de conclusão de curso]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2024.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the influence of the systemic administration of ozone gas on the periodontal repair process of teeth of rats undergoing immediate and late reimplantation. Eighty Wistar rats were divided into four groups: IR-immediate reimplantation (n=20), RT-late reimplantation (n=20), RIO-immediate reimplantation and ozone therapy (n=20), and RTO-late reimplantation and ozone therapy (n=20), evaluated in the experimental periods of 15 and 45 days. Before the immediate reimplantation the teeth were extracted and stored in a dry medium for 5 minutes; and before the late reimplantation the extracted teeth were stored in saline for 30 minutes. For ozone therapy, 3 ml of ozone gas was applied, rectally, at a concentration of 10ug/ml, 2 times a week. After the experimental periods, the rats were euthanized for their right hemi-maxillae to be collected and processed for quantitative and qualitative analyses to be performed. In the immediate reimplantation, the width of the periodontal ligament remained similar in all groups at 15 and 45 days of evaluation, with a percentage of collagen fibers of green and red birefringency similar to the control, however with an increase in the perimeter of red birefringency fibers at 15 days ($p=0.06$). At 45 days, a reduction in the presence of ankylosis was observed in the RIO group ($p=0.05$). In the groups of teeth submitted to late reimplantation, the width of the periodontal ligament showed a reduction at 15 days ($p=0.003$) and normalization of the thickness at 45 days, with a tendency to reduce the collagen fibers of green birefringence in both periods studied, as a result of maturation of the periodontal ligament to ensure dental stability or possible inhibition of cell turnover. At 15 days, the RTO group showed a greater extent and depth of reabsorption, as well as ankylosis, when compared to its respective control; with significant inversion of this behavior at 45 days ($p=0.01$ and $p=0.03$).

Keywords: Dental avulsion. Dental reimplantation. Ozone therapy. Dental resorption. Repair process.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Gerador de ozônio Philozon Medplus MX. 17
- Figura 2 - Representação do tratamento experimental. Administração de 3ml de gás ozônio na concentração de 10µg/ml, 2 vezes por semana, do reimplante dentário a eutanásia. 17
- Figura 3- Esquema da hemi-maxila direita coletada. 19
- Figura 4- Fotomicrografias microscópicas de luz de cortes histológicos longitudinais do incisivo central direito corada com HE, evidenciando dentina (D), cimento (*), ligamento periodontal (LP) e osso (O) aos 15 dias. 23
- Figura 5- Fotomicrografias microscópicas de luz de cortes histológicos longitudinais do incisivo central direito corada com HE, evidenciando dentina (D), ligamento periodontal (LP), osso (O) e reabsorção dentária (*) aos 45 dias. 23
- Figura 6- Fotomicrografias microscópicas de luz polarizada de cortes histológicos longitudinais do incisivo central direito corada com Picrosirius red, evidenciando fibras colágenas de birrefringência verde e vermelha aos 15 dias. 26
- Figura 7- Fotomicrografias microscópicas de luz polarizada de cortes histológicos longitudinais do incisivo central direito corada com Picrosirius red, evidenciando fibras colágenas de birrefringência verde e vermelha aos 45 dias. 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos experimentais e do tratamento antes do reimplante.	18
Tabela 2- Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos na raiz dentária aos 15 dias demonstrando que o grupo RTO apresentou maior extensão e profundidade de reabsorção, bem como anquilose quando comparado ao seu controle(Teste Mann-Whitney para variável ordinal com 5% de nível de significância).	23
Tabela 3- Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos na raiz dentária aos 45 dias demonstrando inversão significativa de comportamento entre o grupo RTO e o seu controle(Teste Mann-Whitney para cada variável ordinal com 5% de nível de significância).	25
Tabela 4- Comparação entre grupos de eventos histomorfológicos no ligamento periodontal aos 15 e 45 dias (Teste t para variáveis contínuas com 5% de nível de significância). Na tabela é observado que no grupo reimplante imediato a largura do ligamento periodontal se manteve semelhante em ambos os períodos experimentais, com porcentagem de fibras de birrefringência verdes e vermelhas parecidas ao controle, porém com aumento do perímetro das fibras vermelhas aos 15 dias. Enquanto, no grupo reimplante tardio, a largura do ligamento periodontal apresentou redução aos 15 dias e normalização da espessura aos 45 dias, com tendência a redução das fibras colágenas de birrefringência verde em ambos os períodos.	28

LISTA DE ABREVIATURAS

2,3-DPG	2,3 Difosfoglicerato
ATP	Adenosina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
IL-1 β	Interleucina 1- beta
IL-6	Interleucina-6
LP	Ligamento periodontal
Nf κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NRF2	Fator nuclear eritróide 2
RI	Reimplante imediato
RIO	Reimplante imediato e ozônioterapia
RT	Reimplante tardio
RTO	Reimplante tardio e ozônioterapia
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	15
3 MATERIAIS E METÓDOS	16
3.1 Animais	16
3.2 Aspectos éticos para o uso dos animais	16
3.3 Anestesia e indução do trauma	16
3.4 Reimplante dentário	17
3.5 Tratamento proposto	17
3.6 Grupos experimentais	18
3.7 Eutanásia e processamento histológico	18
3.8 Coloração Hematoxilina e Eosina	19
3.8.1 Análise histológica	19
3.9 Coloração Picrosirius	20
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5 RESULTADOS	22
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO	31
8 REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diferentes tipos de injúrias traumáticas que acometem a dentição permanente, a avulsão dentária é definida pelo deslocamento total em sentido axial do elemento dentário para fora de seu alvéolo, levando a um comprometimento do ligamento periodontal, cemento e polpa^{1,2}.

A incidência de trauma por avulsão corresponde a uma taxa de 1 a 15% de todas as lesões dentárias, afetando principalmente crianças e adolescentes, causada na maioria das vezes por acidentes com bicicletas, motocicletas, quedas e acidentes domésticos^{3,4}. Os dentes mais acometidos por esse tipo de trauma são os incisivos centrais superiores, devido sua localização na arcada dentária, que o torna mais susceptível à absorção de um impacto traumático^{5,6}.

Há um consenso na literatura de que o tratamento ideal para um dente avulsionado é o reimplante imediato, visto que em condições favoráveis, é capaz de promover melhora estética, socio-emocional, além de preservar o contorno do osso alveolar⁷ ao longo do tempo. No entanto, apesar do reconhecido valor dessa terapia, a experiência clínica tem mostrado que o reimplante imediato raramente ocorre devido a fatores associados ao próprio acidente, como, por exemplo, a ocorrência de lesões extensas que colocam a vida do paciente em risco, a presença de danos na área receptora do elemento a ser reimplantado, as condições emocionais do paciente no momento do acidente, ou simplesmente a falta de conhecimento da população em geral e dos profissionais sobre o reimplante imediato⁸⁻¹⁰.

De maneira geral, ocorre necrose do tecido pulpar devido à incapacidade da polpa em responder a ruptura do feixe vasculonervoso ou à contaminação bacteriana. Nos casos de ruptura, há infarto do tecido pulpar e, por conseguinte, necrose por coagulação. Já no caso de contaminação bacteriana observa-se a formação de intenso infiltrado inflamatório periapical. Esses eventos ocorrem geralmente dentro de até um ano após o trauma e sabe-se que a inflamação periapical provocada pela necrose da polpa está diretamente relacionada à atividade osteoclástica no ápice^{11,12}.

Como parte do processo de cicatrização do periodonto e da polpa, após o reimplante, iniciam-se respostas celulares e moleculares em que as macromoléculas da matriz extracelular tentam criar um ambiente celular necessário para a cicatrização

e a morfogênese^{11,13}. Dentre elas, a produção de citocinas como interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e fator de crescimento epidérmico (EGF) desempenham um papel importante na resposta inflamatória do periodonto e da polpa^{14,15}, que podem contribuir para a diferenciação celular e para quimiotaxia de células de reparo, favorecendo a neoformação tecidual, ou para ativação de osteoclastos e seus precursores, participando de processos de reabsorção radicular e/ou reabsorção óssea, bem como para o desencadeamento de processos de necrose no local da inflamação¹⁵⁻¹⁷.

Novas substâncias capazes de auxiliar o processo de reparo tecidual de dentes reimplantados após avulsão são pesquisadas com o intuito de suprir as falhas deixadas pelos protocolos de uso atual ou potencializando seus resultados¹⁸.

O gás ozônio (O₃) apresenta diversas propriedades terapêuticas, dentre elas a antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomodulador e antioxidante¹⁹.

A ação antimicrobiana do O₃ ocorre devido ao ataque à parede celular bacteriana que oxida glicopeptídeos, glicoproteínas e aminoácidos, alterando sua permeabilidade e causando rápida lise celular, além de promover oxidação dos aminoácidos e ácidos nucleicos ao adentrar a célula^{20,21}.

Os efeitos anti-inflamatórios do O₃ podem estar parcialmente associados à indução da fosforilação e ativação do fator nuclear eritróide 2 (NRF-2), responsável pela modulação da expressão de mais de 200 genes importantes em diversos processos celulares, incluindo a resposta inflamatória, regulação metabólica, proliferação celular, senescência e função mitocondrial^{22,23,25}. Além disso, atua em genes como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase que modulam negativamente citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-8, afetando direta ou indiretamente a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (Nf κ B) e de outras rotas que controlam a inflamação, desempenhando um mecanismo de importância crítica para a proteção e sobrevivência celular^{22,24,25}.

A imunomodulação promovida pelo gás ozônio está relacionado a sua capacidade de liberação de antioxidantes e modulação de agentes pró-inflamatórios, além de estimular a síntese de imunoglobulinas e de células imunocompetentes, aumentando a sensibilidade dos microrganismos à fagocitose, e mostrando-se efetivo na redução da inflamação e do edema em tecidos moles e duros, o que favorece o

reparo^{20,25}.

A propriedade anti-hipóxia é explicada pelo gás ozônio ser um estimulador do fluxo transmembranar de oxigênio, aumentando a taxa glicolítica da adenosina trifosfato (ATP) e 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) na célula, permitindo que a hemoglobina ligada ao oxigênio seja descarregada mais prontamente no interior dos tecidos isquêmicos, melhorando a oxigenação. Além disso, o ozônio aumenta a liberação de óxido nítrico que leva à vasodilatação e ao aumento do fluxo sanguíneo no interior dos tecidos^{20,25}.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi investigar a influência da administração intrarretal de gás ozônio no processo de reparo periodontal de dentes submetidos ao trauma de avulsão e posterior reimplante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização desta pesquisa, foram utilizados 80 ratos machos (Wistar) com idades aproximadas de 120 dias, pesando aproximadamente 250 g.

Os animais foram provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22°C e 24°C, com ciclo de Luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, contendo cinco ratos por gaiola. No interior das gaiolas houve cama de serragem, a qual foi trocada diariamente. Esses animais foram alimentados antes e durante todo o período experimental, com ração sólida triturada e água “ad libitum”.

3.2 Aspectos éticos para o uso dos animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP (nº 455-2020).

3.3 Anestesia e indução do trauma

Os animais foram anestesiados com o emprego de sedativo, Dopaser (Laboratórios Calier AS, Barcelona - Espanha), a base de xilazina (relaxante muscular, analgésico e sedativo) na dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal e de anestésico Vertanacol (Fort Dodge, Iowa - EUA), a base de cloridrato de ketamina a 5% na dosagem de 25 mg/Kg de peso corporal.

O trauma de avulsão foi induzido experimentalmente nos incisivos centrais superiores direitos dos animais. Para isto, os ratos foram posicionados em uma mesa cirúrgica de modo que a movimentação esteve restrita e suas bocas permaneceram abertas durante os procedimentos.

A antissepsia foi realizada na porção anterior da maxila, com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine - Ind Farmac. Rioquímica Ltda), sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito (ICSD) com auxílio de instrumental especialmente adaptado.

3.4 Reimplante dentário

Todos os elementos dentais serão reimplantados em seus respectivos alvéolos, com preparo prévio do mesmo, por meio de curetagem com auxílio de uma cureta cirúrgica e irrigados com soro fisiológico. Nenhuma contenção será realizada. Os animais serão então acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao biotério.

No grupo RI e RIO o reimplante foi realizado 5 minutos após os dentes ficarem 5 minutos em meio seco, já nos grupos RT e RTO o reimplante ocorreu depois de 30 minutos que os dentes ficaram conservados em soro fisiológico.

3.5 Tratamento proposto

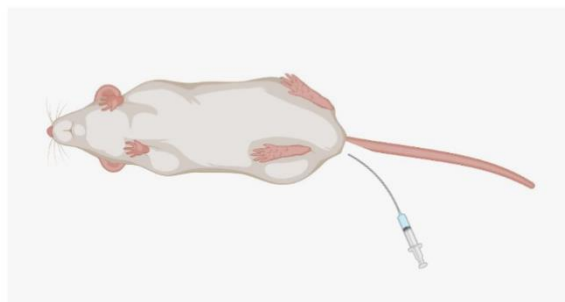
Utilizou-se o equipamento da marca Philozon, modelo Medplus MX (Registro na ANVISA nº80472910001), acoplado a um cilindro de oxigênio. O aparelho foi calibrado em uma concentração de 10ug/ml de gás ozônio, que foi capturado por meio de uma seringa descartável de 5 ml, acoplado a uma sonda número 4, e introduzido no reto do animal. Será aplicado 3 ml do gás ozônio, por via retal, 2 vezes por semana no grupo RIO no grupo RTO.

Figura 1- Gerador de ozônio Philozon.



Fonte: Autor, 2023

Figura 2 - Representação do tratamento experimental. Administração de 3ml de gás ozônio na concentração de 10µg/ml, 2 vezes por semana, do reimplante dentário a eutanásia.



Fonte: Autor, 2023

3.6 Grupos experimentais

Tabela 1- Grupos experimentais e do tratamento antes do reimplante.

Grupos (n=20)	Tratamento antes do reimplante
RI- Reimplante imediato	5 minutos em meio seco
RIO- Reimplante imediato + ozônioterapia	5 minutos em meio seco e administração retal de ozônio via retal
RT- Reimplante tardio	30 minutos em soro fisiológico
RTO- Reimplante tardio + ozônioterapia	30 minutos em soro fisiológico e administração de ozônio via retal

Fonte: Autor, 2023

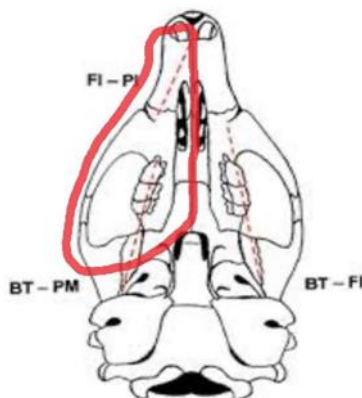
3.7 Eutanasia e processamento histológico

Após 15 e 45 dias do reimplante, os ratos foram eutanasiados por doses excessivas de anestésico. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15, montada em cabo de bisturi número 3, foi feita a dessecção para obtenção da peça anatômica correspondente à maxila direita. As peças obtidas foram fixadas em solução de formalina 10% pH 7,4, por 24 horas, depois disso, descalcificadas em EDTA 4%, pH 2,0. Posteriormente, as peças foram incluídas em parafina e cortadas longitudinalmente, com espessura de 6 µm, de forma semi-seriada com auxílio de um micrótomo.

Após a obtenção dos cortes, a parafina foi eliminada através do processo de desparafinização com xilol (em três banhos de xilol por 5, 10 e 15 minutos cada); e hidratação com sequências decrescentes de álcool 90%, 70%, 50% e lavagem em tampão

fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4 (cada lavagem terá duração de 10 minutos).

Figura 3- Esquema da hemi-maxila direita coletada.



Fonte: Autor, 2023

3.8 Coloração Hematoxilina e Eosina

Após a obtenção das lâminas, as mesmas foram então imergidas em solução de hematoxilina durante 3 minutos e lavadas com água corrente. Em seguida, foram imersas em eosina também durante 3 minutos e lavadas em água destilada. Posteriormente, após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com meio de montagem (Entellan, Merckmillipore, HE, Alemanha) e lamínula de vidro.

3.8.1 Análise histológica

A análise histológica foi realizada qualitativa e quantitativamente em microscopia de luz.

As imagens foram capturadas com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio e as análises histológicas e histomorfométricas foram realizadas em microscopia de luz. No periodonto foi avaliado a presença de reabsorções e anquilose, qualidade do ligamento periodontal e reinserção das fibras do ligamento. Para a quantificação das ocorrências histomorfológicas se atribuiu escores de 1 a 4 aos diferentes eventos abaixo listados, onde 1 corresponde ao melhor resultado e 4 ao pior, ocupando os escores 2 e 3 posições intermediárias.

Eventos considerados para a análise dos resultados:

1) Extensão da reabsorção radicular: Em lâminas representativas foram feitas medidas (em micrometros) da extensão das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos por palatina permitiu a atribuição dos seguintes escores:

- 1 - Ausência de reabsorção;
- 2 - Extensão média de 1 a 1000 micrometros;
- 3 - Extensão média de 1001 a 5000 micrometros;
- 4 - Extensão média maior que 5001 micrometros.

1.2) Profundidade de reabsorção radicular. Em lâminas representativas foram feitas medidas (em micrometros) das maiores profundidades das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos permitiu a atribuição dos seguintes escores:

- 1 - Ausência de reabsorção;
- 2 - Profundidade média de 1 a 100 micrometros;
- 3 - Profundidade média de 101 a 200 micrometros;
- 4 - Profundidade média maior que 201 micrometros.

2) Anquiose:

- 1 - Ausência de anquiose;
- 2 - Pequenos pontos de anquiose;
- 3 - Um terço da raiz está anquilosada;
- 4 - Mais de um terço da raiz está anquilosada.

Apenas o terço médio das raízes foi utilizado para as análises microscópicas, por não sofrer danos durante os procedimentos de exodontia e remoção da papila dental e órgão do esmalte.

3.9 Coloração picrosírius

Após a obtenção dos cortes histológicos, as lâminas foram colocadas em berço de coloração e submetidas aos processos de desparafinização com xilol em três banhos de xilol, respectivamente 5, 10 e 15 minutos cada; hidratação com sequencias decrescentes de álcool 90%, 70%, 50% e lavagem em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4. O material foi então imerso em solução de ácido fosfomolibdico a 0,2% por 2 minutos e posteriormente lavado em água destilada. Após este processo, permanecerá imerso em solução a 0,1% de Picro Sirius (Direct Red 36554-8, Sigma Chemical CO., St. Louis MO, EUA) dissolvido em ácido pícrico a 1,5% (aquoso saturado) por 110 minutos. Em seguida, as lâminas ficaram mergulhadas em solução de ácido clorídrico a 0,1 N por 2 minutos. Depois destas etapas, o material foi lavado em solução de álcool a 70% durante 45 segundos e submetido ao processo de montagem com meio próprio. Para verificação do padrão de qualidade da coloração e a confirmação da refringência das fibras colágenas, as lâminas foram observadas no microscópio de luz polarizada (campo escuro), modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a uma câmara digital modelo Axiocam MRc (Zeiss Vision, Alemanha).

A coloração pelo método de Picrosirius Red foi analisada sob luz polarizada para a avaliação qualitativa e quantitativa do tipo de colágeno predominante (birrefringência verde e vermelha) pelo software Leica LAS 4.12 (Leica Microsystems, Nussloch-Germany) através do microscópio óptico (DM 4000B, Leica, Wetzlar, Alemanha).

4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

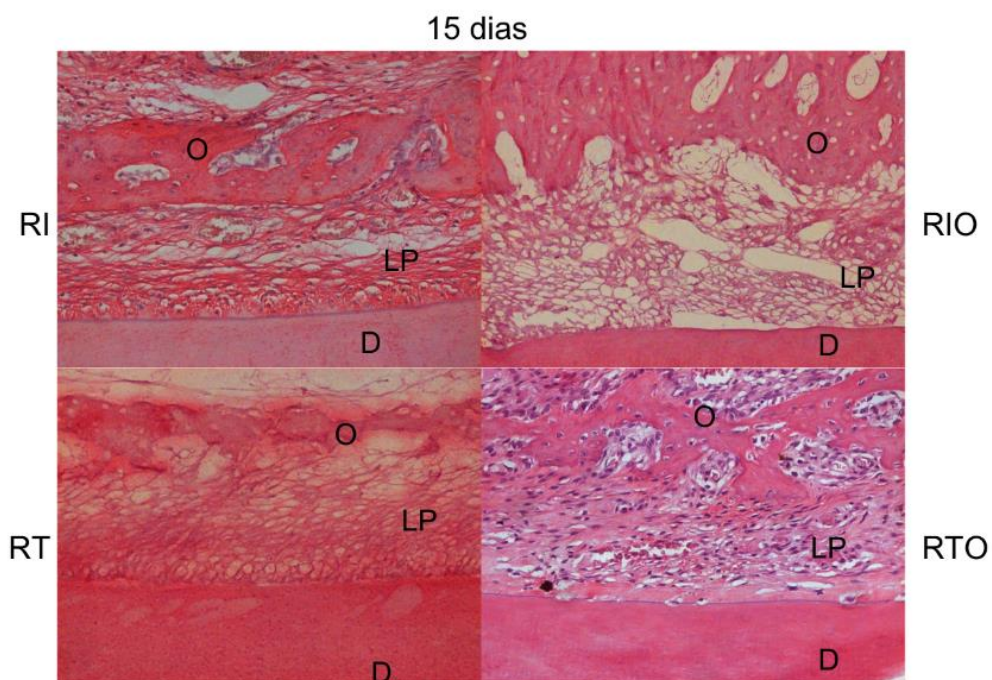
Após aplicação do teste de Shapiro-Wilk para a constatação de normalidade dos dados, a análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 9, sendo usado o Teste t para variáveis contínuas e o teste de Mann-Whitney para variáveis categóricas, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

No reimplante imediato, a largura do ligamento periodontal se manteve semelhante em todos os grupos aos 15 e 45 dias de avaliação, com uma porcentagem de fibras colágenas de birrefringência verde e vermelha semelhante ao controle, contudo com um aumento do perímetro das fibras de birrefringência vermelha aos 15 dias ($p= 0,06$) (Figura 6). Aos 45 dias foi observado uma redução na presença de anquilose no grupo RIO ($p= 0,05$). Já nos grupos de dentes submetidos ao reimplante tardio, a largura do ligamento periodontal apresentou uma redução aos 15 dias ($p= 0,003$) e normalização da espessura aos 45 dias, com tendência a redução das fibras colágenas de birrefringência verde em ambos os períodos estudados (Figura 7), como resultado de maturação do ligamento periodontal para garantir a estabilidade dentária ou possível inibição do turnover celular. Aos 15 dias (Figura 4), o grupo RTO mostrou uma maior extensão e profundidade de reabsorção, bem como anquilose, quando comparado ao seu respectivo controle; com inversão significativa deste comportamento aos 45 dias (Figura 5) ($p= 0,01$ e $p= 0,03$).

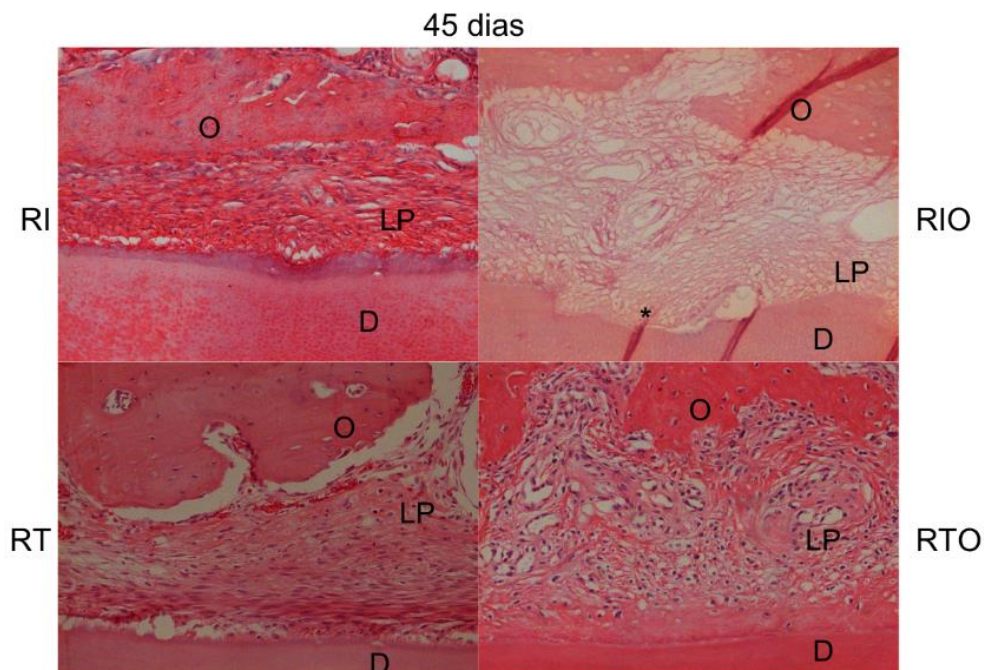
Figura 4- Fotomicrografias microscópicas de luz de cortes histológicos longitudinais do incisivo central direto corada com HE, evidenciando dentina (D), cimento (*), ligamento periodontal (LP) e osso (O) aos 15 dias evidenciando o ligamento periodontal mais

organizado nos grupos RI e RTO.



Fonte: Autor, 2023

Figura 5- Fotomicrografias microscópicas de luz de cortes histológicos longitudinais do incisivo central direto corada com HE, evidenciando dentina (D), ligamento periodontal (LP), osso (O) e reabsorção dentária (*) aos 45 dias mostrando maior presença de fibroblastos nos grupos RI e RTO onde ocorreu maior reparação do ligamento periodontal .



Fonte: Autor, 2023

Tabela 2- - Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos na raiz dentária aos 15 dias demonstrando que o grupo RTO apresentou maior extensão e

profundidade de reabsorção, bem como anquilose quando comparado ao seu controle (Teste Mann-Whitney para variável ordinal com 5% de nível de significância).

Grupos				
Escore	RI	RIO	RT	RTO
Reabsorção dentária - Extensão (%)				
1	40	0	100	40
2	40	67	0	60
3	20	33	0	0
4	0	0	0	0
Valor de P	0,64		0,06	
Reabsorção dentária - Profundidade (%)				
1	75	25	100	40
2	12,5	25	0	20
3	12,5	25	0	40
4	0	25	0	0
Valor de P	0,15		0,06	
Anquilose (%)				
1	100	100	100	80
2	0	0	0	20
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
Valor de P	0,99		0,45	

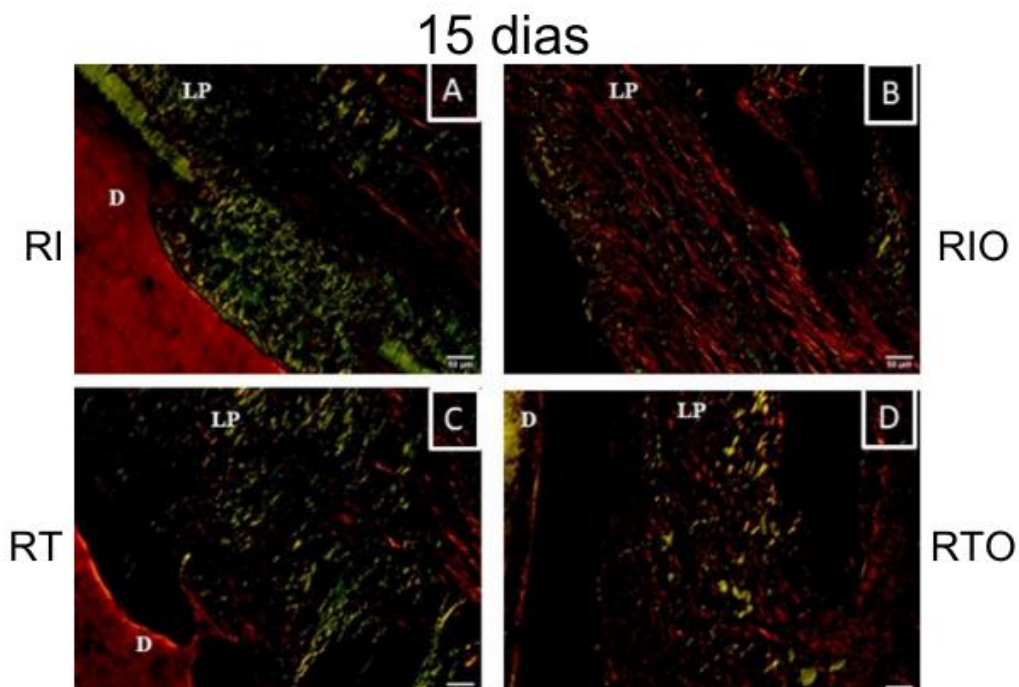
Fonte: Autor, 2023

Tabela 3- Distribuição dos escores e análise estatística dos eventos histomorfológicos na raiz dentária aos 45 dias demonstrando inversão significativa de comportamento entre o grupo RTO e o seu controle (Teste Mann-Whitney para cada variável ordinal com 5% de nível de significância).

Grupos				
Escore/Número de eventos	RI	RIO	RT	RTO
Reabsorção dentária - Extensão				
1	67	37,5	0	67
2	33	37,5	75	17
3	0	25	25	17
4	0	0	0	0
Valor de P	0,45		0,15	
Reabsorção dentária - Profundidade				
1	67	37,5	0	68
2	33	0	0	17
3	0	25	25	17
4	0	37,5	75	0
Valor de P	0,2		0,01*	
Anquilose				
1	33	100	0	100
2	0	0	0	0
3	33	0	100	0
4	33	0	0	0
Valor de P	0,05*		0,03*	

Fonte: Autor, 2023

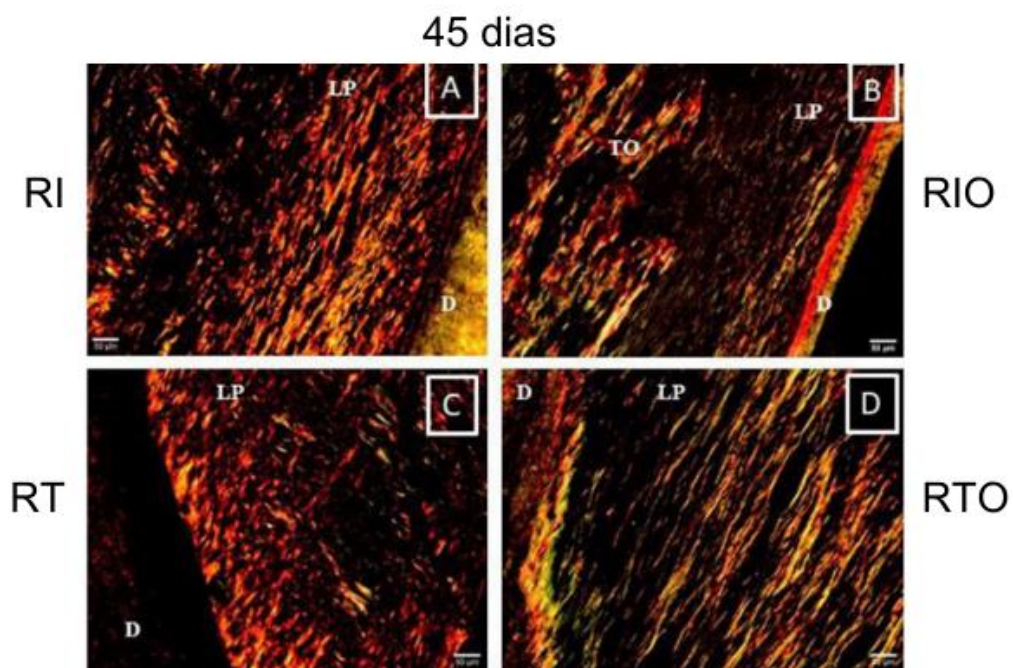
Figura 6- Fotomicrografias microscópicas de luz polarizada de cortes histológicos longitudinais do incisivo central direito corada com Picrosirius red, evidenciando fibras colágenas de birrefringência verde e vermelha aos 15 dias.



Fonte: Autor, 2023

Figura 7- Fotomicrografias microscópicas de luz polarizada de cortes histológicos longitudinais do incisivo central direito corada com Picrosirius red, evidenciando fibras

colágenas de birrefringência verde e vermelha aos 45 dias.



Fonte: Autor, 2023

Tabela 4- Comparação entre grupos de eventos histomorfológicos no ligamento periodontal aos 15 e 45 dias (Teste t para variáveis contínuas com 5% de nível de significância). Na

tabela é observado que no grupo reimplante imediato a largura do ligamento periodontal se manteve semelhante em ambos os períodos experimentais, com porcentagem de fibras de birrefringência verdes e vermelhas parecidas ao controle, porém com aumento do perímetro das fibras vermelhas aos 15 dias. Enquanto, no grupo reimplante tardio, a largura do ligamento periodontal apresentou redução aos 15 dias e normalização da espessura aos 45 dias, com tendência a redução das fibras colágenas de birrefringência verde em ambos os períodos.

Grupos						
Variáveis	15 dias			45 dias		
	RI Média (DP)	RIO Média (DP)	Valor de P	RI Média (DP)	RIO Média (DP)	Valor de P
Largura do LP	419 (172)	414 (287)	0,97	268 (186)	382 (143)	0,30
Área de fibra colágena Birrefringente verde (%)	6,93 (7,5)	0,81 (0,6)	0,22	22,8 (10,1)	16,19 (3,83)	0,002 *
Área de fibra colágena Birrefringente vermelha (%)	5,26 (8,4)	28,9 (26,3)	0,14	19,7 (21,1)	37,5 (26,7)	0,2
Perímetro das fibras de birrefringência verde (px)	94851 (121222)	91282 (79190)	0,96	143689 (86415)	248869 (250523)	0,35
Perímetro das fibras de birrefringência vermelha (px)	200505 (382357)	832674 (282640)	0,06 *	343322 (508326)	790550 (755807)	0,24
	15 dias			45 dias		
	RT	RTO	Valor de P	RT	RTO	Valor de P
Largura do LP	430 (131)	249 (115)	0,003 *	202 (34,8)	315 (111)	0,08
Área de fibra colágena Birrefringente verde (%)	4,91 (2,7)	14,8 (13)	0,14	6,92 (5,91)	17,1 (16,5)	0,21
Área de fibra colágena Birrefringente vermelha (%)	9,63 (6,8)	16,3 (11,3)	0,4	14 (10,2)	18,2 (13,2)	0,55
Perímetro das fibras de birrefringência verde (px)	283078 (151947)	113047 (93516)	0,09	60379 (30574)	409974 (374030)	0,06
Perímetro das fibras de birrefringência vermelha (px)	387384 (216308)	364906 (448478)	0,92	175946 (153612)	589395- 607776	0,17

Fonte: Autor, 2023

6 DISCUSSÃO

Esse estudo avaliou a influência no processo de reparo periodontal de dentes que sofreram reimplante imediato e tardio associado ou não ao uso sistêmico de ozônio via retal.

O reparo do ligamento periodontal de dentes reimplantados é uma condição fundamental para o prognóstico favorável do mesmo. O reimplante imediato favorece melhores resultados na reinserção do LP e menor prevalência de reabsorção inflamatória, reabsorção por substituição e anquilose²⁶.

Os efeitos anti-inflamatórios podem estar associados à indução da fosforilação e ativação do fator nuclear eritróide 2(NRF-2), responsável pela modulação de genes que modulam processos inflamatórios, proliferação celular, senescência e função mitocondrial^{22,24,25}, esse efeito também está relacionado ao fato do O₃ aumentar o transporte de oxigênio no sangue ativando processos aeróbicos, resultando em uma melhora do metabolismo dos tecidos inflamados e consequentemente reduzindo o processo inflamatório²⁷. A ação antimicrobiana do ozônio é pelo dano estrutural causado na parede celular bacteriana, ele reage com ácidos graxos insaturados e proteínas nas membranas celulares, causando desnaturação da membrana, diminuição da atividade das enzimas celulares e interrupção das funções respiratórias celulares, característica essa que o torna uma substância para ser utilizada como antisséptico^{18,28}. Além disso, o efeito antioxidante é pelo fato do estresse oxidativo ativar também o fator nuclear eritróide 2, que é responsável por ativar a transcrição de elementos de resposta antioxidantes como glutathione peroxidase e catalase. Fora essas características, o O₃ permite que a hemoglobina ligada ao oxigênio seja descarregada mais facilmente para os tecidos isquêmicos¹⁹⁻²¹.

Nesse estudo o uso do ozônio sistêmico no grupo reimplante imediato teve um efeito positivo, porque em ambos os períodos estudados esse grupo apresentou semelhança na largura do ligamento periodontal e na porcentagem mais alta da área das fibras de birrefringência vermelha, que são fibras maduras, quando comparado ao seu grupo controle. Esse aumento das fibras colágenas maduras mostra que o ozônio sistêmico pode contribuir no amadurecimento dessas fibras por ele ser uma substância auxiliadora em processos regenerativos, porque acarreta a migração acelerada de

células, aumentando a atividade de fibroblastos, síntese de colágeno e de citocinas^{29,30}.

No reimplante imediato as fibras de birrefringência verde tiveram áreas semelhantes no período de 15 dias, entretanto no grupo RIO, aos 45 dias, elas tiveram uma diminuição quando comparadas ao seu grupo controle mostrando amadurecimento das fibras nesse período. O perímetro das fibras de birrefringência verde foi semelhante nos dois grupos de reimplante imediato e em ambos os períodos, enquanto no grupo RIO 15 dias o perímetro das fibras colágenas vermelhas se apresentou maior quando comparada ao grupo controle, mostrando dessa forma que o amadurecimento das fibras foi mais rápido nesse período, indo ao encontro de estudos que afirmam que o ozônio possui propriedades restauradoras por mostrar maior expressão de mediadores, como fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento beta e fator de crescimento vascular³¹.

No grupo reimplante tardio ozônio 15 dias, quando comparada a largura do ligamento periodontal com seu grupo controle foi observada diminuição dessa variável, entretanto ocorreu normalização desta no período de 45 dias. As áreas das fibras de birrefringência verde não tiveram diferenças estatísticas entre os grupos, porém pôde ser vista uma tendência a redução dessas fibras e uma tendência a um aumento das fibras de birrefringência vermelha nos grupos tratados com ozônio. Esses resultados podem ter ocorrido em virtude do ozônio favorecer o reparo tecidual pela modulação de genes que modulam processos inflamatórios, proliferação celular, senescência e função mitocondrial^{22,24,25} concordando com outros estudos feitos em ratos tratados com ozônio onde foi encontrado uma maior taxa de epitelização e tecido de granulação com um menor número médio de neutrófilos, além de maior celularidade dérmica e deposição intensa de colágeno em comparação com o grupo controle³².

O uso do ozônio sistêmico mostrou resultados promissores nesse estudo, porque apesar do grupo RIO apresentar, no período de 15 dias, maior extensão e profundidade da reabsorção dentária, bem como presença de anquilose, aos 45 dias houve inversão significativa desses resultados, onde o grupo tratado com ozônio se saiu melhor nas variáveis de reabsorção dentária e anquilose quando comparadas ao grupo controle, inclusive com nenhuma amostra apresentando presença de anquilose, assim como o grupo RIO, mostrando que o ozônio talvez possa auxiliar também na

remineralização dentária e ajudar a não formação de anquilose.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso sistêmico de ozônio via retal é um tratamento coadjuvante que pode reduzir os eventos de anquilose, a profundidade das reabsorções dentárias e estimular a maturação das fibras colágenas do ligamento periodontal no reimplante dentário imediato e tardio.

REFERÊNCIAS

1. Hermann NV, Lauridsen E, Ahrensburg SS, Gerds TA, Andreasen JO. Periodontal healing complications following extrusive and lateral luxation in the permanent dentition: a longitudinal cohort study. *Dent Traumatol.* 2012;28:394-402.
2. Lee R, Barrett EJ, Kenny DJ. Clinical outcomes for permanent incisor luxations in a pediatric population. II. Extrusions. *Dent Traumatol.* 2003;19:274-9.
3. Ugolini A, Parodi GB, Casali C, Silvestrini-Biavati A, Giacinti F. Work-related traumatic dental injuries: prevalence, characteristics and risk factors. *Dent Traumatol.* 2017;34:36-40.
4. Schwartz O, Andreasen FM, Andreasen JO. Effects of temperature, storage time and media on periodontal and pulpal healing after replantation of incisors in monkeys. *Dent Traumatol.* 2002;18:190-5.
5. Petti S, Glendor U, Andersson L. World traumatic dental injury prevalence and incidence, a meta-analysis - One billion living people have had traumatic dental injuries. *Dent Traumatol.* 2018;34:71-86.
6. Mustafa Ali M, Al Zoubi L, Eissa M. Changes in the epidemiology and aetiology of dental traumatic injuries in permanent teeth in children before and after German unification. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2019;20:41-6.
7. Brandini DA, Amaral MF, Debortoli CVL, Panzarini SR, Brandini DA, Amaral MF. Immediate tooth replantation: root canal filling for delayed initiation of endodontic treatment. *Braz Oral Res.* 2018;32:e7.
8. Cardoso LC, Poi WR, Panzarini SR, Sonoda CK, Rodrigues TS, Manfrin TM. Knowledge of firefighters with special paramedic training of the emergency management of avulsed teeth. *Dent Traumatol.* 2009;25:58-63.
9. Cohenca N, Forrest JL, Rotstein I. Knowledge of oral health professionals of treatment of avulsed teeth. *Dent Traumatol.* 2006;22:296-301.
10. Panzarini SR, Pedrini D, Brandini DA, Poi WR, Santos MF, Correa JPT, et al. Physical education undergraduates and dental trauma knowledge. *Dent Traumatol.* 2005;21:324-8.

11. Barnett F. The role of endodontics in the treatment of luxated permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2002;18:47-56.
12. Nishioka M, Shiiya T, Ueno K, Suda H. Tooth replantation in germ-free and conventional rats. *Dent Traumatol.* 1998;14:163-73.
13. Andreasen JO. Pulp and periodontal tissue repair - regeneration or tissue metaplasia after dental trauma. A review. *Dent Traumatol.* 2012;28:19-24.
14. Ozeki N, Yamaguchi H, Hiyama T, Kawai R, Nakata K, Mogi M, et al. IL -1 β -induced matrix metalloproteinase-3 regulates cell proliferation in rat dental pulp cells. *Oral Dis.* 2015;21:97-105.
15. Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor α in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res.* 2002;33:482-4.
16. Lima TFR. Relationship between initial attendance after dental trauma and development of external inflammatory root resorption. *Braz Dent J.* 2017;28:201-5.
17. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis.* 2012;18:236-43.
18. Iliadis D, Millar B. Ozone and its use in periodontal treatment. *Open J Stomatol.* 2013;3:197-202.
19. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res.* 2017;7(3):212-9.
20. Ugazio E, Tullio V, Binello A, Tagliapietra S, Dosio F. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules.* 2020;25:334.
21. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans.* 2015;43:621-6.
22. HayesAlbena JD, Dinkova-Kostova T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:199-218.

23. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:1304-9.
24. Hahn GF, Oliveira JR, Bock PM. O papel do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. *Clin Biomed Res*. 2017;37:203-13.
25. Saglam E. Evaluation of the effect of topical and systemic ozone application in periodontitis: an experimental study in rats. *J Appl Oral Sci*. 2020;28:e20190140.
26. Andreasen FM, Andreasen JO. Diagnosis of luxation injuries: The importance of standardized clinical, radiographic and photographic techniques in clinical investigations. *Endo Dent Traumatol* 1985; 7: 160-9.
27. Vinutha RS, Reema Lakshmanan MDS. Ozone and its role in periodontal therapy- a review. *IOSR J Dent Med Sci*. 2014;13:107-10.
28. Morita T, Yamazaki Y, Fujiharu C, Ishii T, Seto M, Nishinoue N, et al. Association between the duration of periodontitis and increased cardiometabolic risk factors: a 9-year cohort study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2016;14:475-82.
29. Almaz ME, Sönmez I. Ozone therapy in the management and prevention of caries. *J Formos Med Assoc*. 2015; 114:3-11
30. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent*. 2008;36:104-16
31. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci*. 2009;24:368-74.
32. Clavo B, Pérez JL, López L, Suárez G, Lloret M, Rodríguez V, et al. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. *J Altern Complement Med*. 2003;9:251-6.