

ANA MAIRA PEREIRA BAGGIO

**Ozonioterapia sistêmica como terapia auxiliar na
regeneração óssea guiada**

**Araçatuba
2023**

ANA MAIRA PEREIRA BAGGIO

**Ozonioterapia sistêmica como terapia auxiliar na
regeneração óssea guiada**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Implantodontia.

Orientadora: Prof^ª. Ass. Ana Paula Farnezi Bassi

**Araçatuba
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B144o Baggio, Ana Maira Pereira.
Ozonioterapia sistêmica como terapia auxiliar na
regeneração óssea guiada / Ana Maira Pereira Baggio. -
Araçatuba, 2023
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Ana Paula Farnezi Bassi

1. Regeneração óssea 2. Materiais biocompatíveis
3. Ozônio I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico esse trabalho:

A Deus, que me sustentou até aqui, pois sem ele nada seria possível;

A minha família que me apoia, incentiva e acredita no meu potencial, estando comigo em cada degrau alcançado;

As minhas queridas avós, Rocca Zendira Rossi Pereira (*in memoriam*) e Adelaide Guerino Baggio, minha eterna gratidão por tudo que aprendi com as senhoras.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, tornando a caminhada mais leve e feliz.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a **Deus** por me abençoar a cada dia e por todas as oportunidades que me foram concedidas. Por ser meu alicerce e me permitir chegar até aqui, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, **João Batista Baggio** e **Maria Lúcia Pereira Baggio** que nunca mediram esforços para me ver feliz e realizada me apoiando em todos os momentos e escolhas possíveis. Obrigada por tudo que já fizeram e ainda fazem por mim e pelo meu irmão, por sempre priorizarem nossa educação e abrirem mão dos próprios sonhos pelos nossos; por me incentivarem, e nunca me deixarem desanimar nessa jornada. Obrigada por toda educação e princípios transmitidos, e por darem o devido valor ao estudo que sempre nos foi proporcionado com prioridade. Nada disso seria possível sem vocês. Obrigada por serem os melhores pais do mundo, essa conquista é nossa.

Ao meu irmão, **João Pedro Pereira Baggio** por ser o meu melhor amigo, meu exemplo, companheiro de tantas fases e momentos, e por acreditar e confiar em mim mais do que eu mesma, me apoiar e torcer tanto pela minha felicidade e pelo meu sucesso pessoal e profissional. Encontrar no meu irmão o meu melhor amigo, é um presente de Deus.

A minha querida avó materna **Rocca Zendira Rossi Pereira** (*in memoriam*), pelo orgulho que sentia das minhas conquistas. Meu exemplo de mulher sábia, guerreira e de coração ímpar, que sempre serviu de inspiração para seus filhos e netos e estará sempre viva em nossos corações.

A toda a minha **família**, que sempre torceu por mim e me apoiou, sentindo orgulho e vibrando a cada etapa concluída, me amparando sempre que necessário com palavras de conforto e incentivo.

Aos meus **amigos de infância** por todos os momentos compartilhados e por se manterem sempre presentes apesar dos rumos diferentes que nossas vidas tomaram. Ver as conquistas e o sucesso de vocês me deixa extremamente feliz e orgulhosa.

Aos **amigos ganhos na graduação**, com quem compartilhei tantos momentos que ficarão sempre guardados com muito carinho, cresci e aprendi tanto e hoje são meus colegas de profissão. Obrigada por todo apoio e incentivo, sei que ganhei amigos pra vida toda.

A **Mirela Caroline Silva, Fernanda de Souza Camilo e Stéfani Caroline Ferriolli**, por se tornarem minha família em Araçatuba desde o primeiro ano da graduação e por termos aprendido e crescido tanto juntas. Agradeço por se tornarem parte da minha vida, o caminho foi mais leve e alegre com vocês. Vocês são verdadeiras irmãs para mim.

A minha orientadora, **Prof^a. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi** por todo suporte e paciência desde a graduação. Pela oportunidade de ser sua orientada de iniciação científica e confiar em mim para continuar como parte da sua equipe também como mestranda. Por todo conhecimento transmitido e por ser uma grande inspiração profissional.

Ao professor **Dr. Leonardo Perez Faverani** por todo auxílio durante esses anos e por me acolher como parte do seu grupo de pesquisa, pela oportunidade de trabalharmos juntos na diretoria da Liga Acadêmica de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da FOA-UNESP.

A professora **Prof^a. Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli** pelo aceite de compor a minha banca avaliadora e pelas contribuições de grande valia neste trabalho.

Aos demais professores da Pós-Graduação, **Dra. Daniela Ponzoni, Dr. Francisley Ávila de Souza, Dr. Osvaldo Magro Filho, Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, por serem peças fundamentais na minha formação.

Ao doutorando **Ms. Vinícius Ferreira Bizelli** por ser meu professor e minha maior inspiração dentro da pós-graduação. Obrigada pela paciência e maestria com que me ensinou durante esses anos, por ser responsável direto pelo meu sucesso na pós-graduação.

A todos os alunos de Iniciação Científica do nosso grupo de pesquisa, que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho, e que me ensinam um pouco mais a cada dia. Em especial a **Izabela Fornazari Delamura** que nunca mediu esforços para que esse projeto se concretizasse da melhor forma possível.

Aos demais amigos da pós-graduação, **Stefany Barbosa, João Matheus Fonseca e Santos, Murilo Carvalho de Souza, Edith Umami Ramos, Luana Oliveira, Paulo Honda e Harrison**, pela troca dentro e fora da faculdade e por torcerem pelo meu sucesso assim como torço por vocês.

AGRADECIMENTOS

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - FOA- UNESP** na pessoa do atual diretor Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara, por ter me oferecido toda a infraestrutura e todos os recursos necessários que me permitiram uma ótima graduação, e pós-graduação. Continuar nesta instituição responsável por toda minha formação, é motivo de muito orgulho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa do atual Coordenador Prof. Ass. Wirley Gonçalves Assunção.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pelo carinho e atenção sempre oferecidos.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada **Paulo e Marco** por todo auxílio no processamento laboratorial deste e de outros trabalhos.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela atenção oferecida.

A **Seção técnica de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pelos esforços diários para que esta etapa se concretizasse com êxito.

Aos **animais**, *in memoriam*, que tiveram suas vidas sacrificadas em prol da ciência.

*“Tão importante quanto a chegada é o caminho percorrido, pois
o que vivemos no percurso nos faz chegar mais evoluídos”.*

Plínio de Sá

BAGGIO, A. M. P. **Ozonioterapia sistêmica como terapia auxiliar na regeneração óssea guiada**. 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Processos regenerativos são procedimentos frequentes na odontologia atual. Entender e viabilizar esses processos associados a terapias auxiliares que melhoram ou aceleram essa prática podem ser relevantes diante dos desafios nas reconstruções. O objetivo do estudo visou avaliar o possível benefício da terapia com ozônio, quando aplicada juntamente com membranas biodegradáveis em defeitos críticos em calotas de ratos jovens na regeneração óssea guiada. Foram utilizados 96 ratos Wistar machos divididos em 4 grupos e um defeito crítico na calota de todos os animais foi realizado com 8mm de diâmetro. O Grupo BIO, teve o defeito crítico preenchido por uma membrana de colágeno porcino (BioGide®); o Grupo BIO+OZ, que somado a membrana os animais receberam a ozonioterapia sistêmica via intraperitoneal; o Grupo COA+OZ que teve o defeito preenchido pelo coágulo sanguíneo e os animais também receberam a ozonioterapia sistêmica e Grupo COA que teve o defeito crítico preenchido apenas pelo coágulo sanguíneo. Os tempos experimentais foram de 7, 15, 30 e 60 dias. As peças foram analisadas quanto à histologia, perfil inflamatório, parâmetros volumétricos pela microCT, potencial osteogênico, análise quantitativa de neoformação óssea na região do defeito e análise estatística. Os dados obtidos revelaram que os grupos tratados com a ozonioterapia atingiram resultados superiores em todos os parâmetros quando comparados aos animais que receberam apenas a membrana de colágeno porcino ou tiveram o defeito crítico preenchido apenas pelo coágulo sanguíneo. Portanto, foi possível concluir que a ozonioterapia tem influência positiva nos processos regenerativos, induz a proliferação celular e a resposta cicatricial.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis. Ozônio.

BAGGIO, A. M. P. **Ozonioterapia sistêmica como terapia auxiliar na regeneração óssea guiada**. 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Regenerative processes are frequent procedures in current dentistry. Understanding and enabling these processes associated with auxiliary therapies that improve or accelerate this practice can be relevant in the face of challenges in reconstructions. The objective of the study was to evaluate the possible benefit of ozone therapy, when applied together with biodegradable membranes in critical defects in calfs of young rats in guided bone regeneration. 96 male Wistar rats divided into 4 groups were used and a critical defect in the calvaria of all animals was performed with 8mm in diameter. The BIO Group had the critical defect filled by a porcine collagen membrane (BioGide®); the BIO+OZ Group, which added to the membrane, the animals received systemic ozone therapy intraperitoneally; the COA+OZ Group that had the defect filled by the blood clot and the animals also received systemic ozone therapy and the COA Group that had the critical defect filled only by the blood clot. The experimental times were 7, 15, 30 and 60 days. The pieces were analyzed for histology, inflammatory profile, volumetric parameters by microCT, osteogenic potential, quantitative analysis of bone neoformation in the region of the defect and statistical analysis. The data obtained revealed that the groups treated with ozone therapy achieved superior results in all parameters when compared to the animals that received only the porcine collagen membrane or had the critical defect filled only by the blood clot. Therefore, it was possible to conclude that ozone therapy has a positive influence on regenerative processes, induces cell proliferation and healing response.

Keywords: Bone Regeneration. Biocompatible biomaterials. Ozone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cirurgia experimental realizada em calota, após a antissepsia da região. A: tricotomia e incisão em V no sentido occipito-frontal; B: calvária exposta após descolamento total do retalho; C: marcação do defeito de 8 mm a ser criado e D: defeito crítico de 8 mm realizado preservando a dura-máter.	24
Figura 2. Instalação da membrana de colágeno porcino sobre o defeito ósseo crítico. A: membrana BioGide® colocada em posição; B: tecidos moles reposicionados; C: sutura interrompida simples com fio Nylon 5.0.....	25
Figura 3. Aplicação do ozônio via intraperitoneal na dosagem de 0,7 ml/kg.	26
Figura 4. Corte longitudinal obedecendo a margem de segurança ao redor de todo o defeito, separando-o ao meio para inclusão em parafina.....	27
Figura 5. Cortes representativos de 6 µm de espessura de cada bloco de parafina já montados em lâminas	27
Figura 6. Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 4.0x. O defeito crítico de 8 mm de diâmetro externo, está delimitado pelo { } e os * indicam os cotos ósseos.....	31
Figura 7. Figura 7. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BG aos 7 dias magnificações de 40x e 100x. Na região dos cotos observa-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) rico em fibroblastos (setas amarelas). No centro do defeito, nota-se um tecido conjuntivo (TC) rico em células e a nítida presença da membrana (M) de colágeno porcino.....	32
Figura 8. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível notar o início do processo de neoformação óssea (as setas azuis indicam as células osteoprogenitoras), envolto por tecido conjuntivo (TC) bem vascularizado (os * indicam os vasos sanguíneos). No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito, bem celularizado.	33
Figura 9. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível notar o início do processo de neoformação óssea (TON), envolto por tecido conjuntivo (TC) bem celularizado (as setas amarelas indicam os linfócitos e os	

* indicam os vasos sanguíneos). No centro do defeito nota-se o tecido ósseo neoformado (TON) envolto por tecido conjuntivo.34

Figura 10. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. É possível observar tanto a partir dos cotos, como no centro do defeito uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado (TON) com a presença de grandes vasos sanguíneos (*) e osteoblastos (seta azul) em toda a extensão do defeito.34

Figura 11. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO+OZ aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível um tecido conjuntivo (TC) bem vascularizado (os * indicam os vasos sanguíneos e as setas amarelas indicam os fibroblastos). No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito, que está preenchido por um tecido conjuntivo (TC) com fibroblastos mais orientados.....35

Figura 12. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO+OZ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível notar o início do processo de neoformação óssea (TON) em direção ao centro do defeito, além da presença de um tecido conjuntivo (TC) maduro, com vasos sanguíneos grandes e fibroblastos (setas amarelas) orientados. No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito, com ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) ao seu redor.36

Figura 13. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO+OZ aos 30 dias nas magnificações de 40x e 100x. Na região dos cotos nota-se tecido ósseo neoformado (TON) significativo, bem celularizado com alguns fibroblastos (setas amarelas) e células osteoprogenitoras na superfície (seta azul). No centro do defeito é possível observar tecido ósseo neoformado (TON) em toda a extensão, com grandes vasos sanguíneos (*) e algumas áreas de tecido conjuntivo (TC) maduro, com fibroblastos e fibroblastos bem organizados.37

Figura 14. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO+OZ aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível notar o processo de neoformação óssea, com ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) mais maduro, com células osteoprogenitoras (seta azul), envolto por um tecido conjuntivo (TC) denso, com vasos sanguíneos de grande calibre (*) e fibroblastos (setas amarelas). No centro, nota-se tecido ósseo (TON) em toda a

extensão e algumas áreas de tecido conjuntivo (TC) com fibras colágenas bem organizadas.....38

Figura 15. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA+OZ aos dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Na área dos cotos (C) nota-se algumas ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) em direção ao centro, envoltas por tecido conjuntivo (TC) muito vascularizado, com vasos sanguíneos de grande calibre (*) e fibroblastos ao redor (setas amarelas). No centro do defeito observa-se atividade fibroblástica intensa (setas amarelas, tecido conjuntivo (TC) frouxo e pequenas ilhas de tecido ósseo neoformado (TON).39

Figura 16. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA+OZ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Na região dos cotos nota-se ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) que se direcionam para o centro do defeito e um tecido conjuntivo (TC) denso e organizado. No centro do defeito é possível notar tecido ósseo neoformado (TON) significativo e tecido conjuntivo (TC) com intensa atividade fibroblástica e muitos vasos sanguíneos. Os (*) indicam os vasos sanguíneos, as setas azuis os osteoblastos e as setas amarelas os fibroblastos.39

Figura 17. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA+OZ aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Na área dos cotos (C) nota-se grande quantidade de tecido ósseo neoformado (TON) com alguns osteoblastos (setas azuis) e alguns vasos sanguíneos (*). No centro do defeito, é possível notar tecido ósseo neoformado (TON) em toda a extensão, com algumas áreas de tecido conjuntivo (TC) fibroso, organizado, com vasos sanguíneos (*) e fibroblastos (setas amarelas).40

Figura 18. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA+OZ aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. A região de coto ósseo se confunde com a área total de tecido ósseo neoformado (TON), sendo possível observar tecido ósseo ativo pela presença de osteócitos viáveis (setas azuis). No centro do defeito, grande área de tecido ósseo neoformado (TON) é observada, garantindo o fechamento total do defeito.41

Figura 19. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo COA aos 7 dias de reparo nas magnificações de 40x e 100x. É possível notar grande quantidade de tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos de grande calibre, e intensa atividade

fibroblástica (setas amarelas) tanto a partir dos cotos, como no centro do defeito.

.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 20. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Nota-se a presença de pequenas ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) somente na região dos cotos. Na região central existe um tecido conjuntivo (TC), neoformação vascular (*) e grande quantidade de células (setas amarelas) ao redor dos vasos e no interior do tecido de granulação.42

Figura 21. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA aos 30 dias de reparo nas magnificações de 40x e 100x. A área de tecido ósseo neoformado (TON) continua apenas na região de coto ósseo. Existe a presença de um tecido conjuntivo (TC) fibroso, mais organizado, com grandes aglomerados celulares tanto nos cotos, como no centro do defeito.42

Figura 22. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA aos 60 dias de reparo nas magnificações de 40x e 100x. É possível observar tecido ósseo neoformado (TON) na região dos cotos em direção ao centro, além da presença de células osteoprogenitoras (seta azul) e fibroblastos (seta amarela). Tecido conjuntivo (TC) mais organizado, grandes vasos sanguíneos (*) e aglomerados celulares (setas amarelas) na região central do defeito ósseo.....44

Figura 23. Gráfico representativo das comparações das médias e desvio padrão inter e intragrupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) nos períodos de 7 e 15 dias. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas significantes intergrupos e as minúsculas demonstram se houve diferença estatística significativa intragrupo no período de 7 para 15 dias. As fotomicrografias ao lado foram realizadas em um aumento de 100x, as setas amarelas indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos.45

Figura 24. Gráfico representativo das comparações das médias e desvio padrão inter e intragrupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos nos períodos de 7 e 15 dias. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas significantes intergrupos e as minúsculas demonstram se houve diferença estatística significativa intragrupo no período de 7 para 15 dias. As fotomicrografias ao lado foram realizadas em um aumento de 100x, as setas amarelas indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos.46

Figura 25. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA) para os tempos experimentais de 7,15,30 e 60 dias. As letras maiúsculas demonstram as diferenças estatísticas significantes intergrupos e as letras minúsculas demonstram as diferenças estatísticas intragrupos.	48
Figura 26. Gráficos demonstrando a média e o desvio padrão dos parâmetros BV e BV/TV, no período de 60 dias para os grupos BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA. As diferenças estatísticas significantes entre os grupos estão representadas pelas letras minúsculas diferentes (a, b, c e d).....	49
Figura 27. Gráficos demonstrando a média e o desvio padrão dos parâmetros Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N e Po(tot), no período de 60 dias para os grupos BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA. As diferenças estatísticas significantes entre os grupos estão representadas pelas letras minúsculas diferentes (a, b, c e d).	51
Figura 28. Reconstrução axial do defeito crítico na calota dos animais dos grupos BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA eutanasiados aos 60 dias pós-operatórios.....	50

LISTA DE SIGLAS

BIO	Grupo membrana BioGide®
BIO+OZ	Grupo membrana BioGide®+ozônio
COA	Grupo coágulo
COA+OZ	Grupo coágulo+ozônio
O ₃	Ozônio
ROG	Regeneração óssea guiada
TC	Tecido conjuntivo
TON	Tecido ósseo neoformado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAL E MÉTODO	21
4 RESULTADOS	30
4.1 Avaliação Histológica (morfologia)	30
4.2 Análises Histométricas	44
4.2.1 Perfil inflamatório (células e vasos sanguíneos)	44
4.2.2 Área de osso neoformado (AON)	47
4.3 Análise de Micro TC	48
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO*

A utilização de biomateriais que auxiliam na substituição e na regeneração da estrutura óssea e dos tecidos biológicos em geral, tem contribuído de forma significativa para o avanço da Odontologia, em especial da Implantodontia, já que o aumento exponencial na reabilitação com implantes osseointegráveis em maxilas atróficas tornou a regeneração óssea guiada (ROG) uma prática comum dentro da especialidade [1].

Diante do expressivo aumento do uso clínico desses biomateriais e da grande concorrência existente no mercado, essa área tem sido alvo constante de pesquisas científicas na busca de biomateriais sintéticos ideais, que sejam compatíveis e capazes de induzir uma resposta adequada dos tecidos vivos apresentando propriedades químicas, físicas e biológicas satisfatórias, tanto quanto os materiais autógenos [1,2], adotados atualmente como padrão ouro em consequência de suas propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras.

Sobre o tecido ósseo, é importante salientar que se trata de um tecido conjuntivo altamente organizado, que possui capacidade de reconstruir sua estrutura original na presença de condições estáveis, suprimento sanguíneo adequado e células osteoprogenitoras. Sua composição é formada por uma porção orgânica (células e matriz extracelular) e uma porção inorgânica (minerais), e a interação entre esses componentes está diretamente relacionada com a capacidade de regeneração desse tecido [1-3]. Com o intuito de obter sucesso na reabilitação oral com implantes osseointegráveis, uma quantidade mínima, tanto de altura como de largura óssea é necessária para a longevidade e sucesso do tratamento. Tendo em vista pacientes que necessitam de reconstruções e regenerações ósseas, diversas técnicas de enxertia e biomateriais que auxiliem nesse processo de reparo vêm sendo aprimorados [3]. Os biomateriais devem ser usados com cautela, sempre levando em consideração suas indicações clínicas, bem como os riscos e os benefícios do tratamento [2].

* Normalizado de acordo com a revista Membranes -
<https://www.mdpi.com/journal/membranes/instructions>

Neste contexto, a ROG tornou-se uma prática comum e necessária na Implantodontia e a utilização de membranas biológicas que atuam como uma barreira para a seleção celular bloqueando a proliferação de tecidos não osteogênicos tornou-se fundamental [3]. No processo de reparação, as membranas desenvolvem o papel de prevenir a migração e ação dos fibroblastos e excluem fatores inibidores por desencadearem uma vascularização adequada, estabilização, espaço para aumento ósseo e exclusão de tecidos competidores, além de concentrarem fatores estimuladores de crescimento local, sendo consideradas fontes de células osteogênicas. Para obter sucesso clínico, as membranas devem ser biocompatíveis, inertes, semipermeáveis permitindo a difusão de plasma e nutrientes, mecanicamente resistentes, não alergênicas e não carcinogênicas [4–6].

Comercialmente encontramos variados tipos de membranas, reabsorvíveis e não-reabsorvíveis, e com o propósito de avaliar o comportamento biológico dessas barreiras, estudos *in vivo* e *in vitro* são realizados para que possam ser indicadas para o uso clínico. As membranas reabsorvíveis mais utilizadas atualmente são compostas por polímeros artificiais ou naturais a fim de que sejam eliminadas durante a regeneração, descartando a necessidade de um segundo tempo cirúrgico [7–9].

O colágeno é um polímero de origem natural, que apresenta características de biocompatibilidade, atração de neutrófilos e quimiotaxia para fibroblastos, o que o habilita como um bom material para a ROG. Portanto, membranas que possuem colágeno em sua composição auxiliam na cura da ferida através da fixação do coágulo, estabilização da ferida e homeostase celular. Além disso, o colágeno permite fácil manuseio e adaptação da barreira no defeito [10–12].

A membrana Bio-Gide®, considerada como a membrana reabsorvível padrão ouro atualmente, é preparada a partir de colágeno tipo I e tipo III derivado de pele porcina, possui grande potencial de regeneração e reabsorve em cerca de 8 semanas [4,5,13]. As características de hidrofília e maleabilidade desta membrana a tornam fácil de ser adaptada. Possui uma camada lisa e uma camada porosa agindo como barreira e como guia para as células ósseas, para o tecido mole e também para os vasos sanguíneos [4,13].

Diante do cenário da busca de biomateriais e de terapias adjuvantes que possam auxiliar na regeneração óssea, o tratamento com ozônio (O₃) vem ganhando espaço, já que tem capacidade de acelerar a resposta cicatricial e oferecer benefícios importantes nos processos regenerativos.

Apesar da ozonioterapia ainda apresentar evidências insuficientes ou conflitantes como alternativa terapêutica em cirurgia oral, evidências são encontradas dentro da odontologia restauradora, e estudos em animais vêm mostrando resultados positivos do uso do ozônio nos processos regenerativos devido aos efeitos anti-inflamatórios, cicatrizantes e antimicrobianos [14–17].

O ozônio (O₃) é uma molécula composta por três átomos de oxigênio, que nas condições normais de temperatura e pressão normalmente se apresenta na forma gasosa, mas também pode ser utilizado na forma de óleo ou água ozonizada [16–20]. A administração do ozônio pode ser realizada de maneiras distintas, incluindo aplicações tópicas ou sistêmicas [14,19,21] e seu uso é capaz de neutralizar mediadores neuroquímicos da sensação dolorosa, facilitando a metabolização e eliminação de mediadores inflamatórios como histamina, quinina e bradicinina [19,21–23].

O ozônio pode interagir com componentes do sistema vascular melhorando a microcirculação nos tecidos e a circulação sanguínea periférica. Sua aplicação inicia a cicatrização precoce de feridas, melhorando as propriedades dos eritrócitos e facilitando a liberação de oxigênio. Além disso, possui efeito antimicrobiano, imunoestimulante e desintoxicante, bioenergético e analgésico, ativa a função dos macrófagos e aumenta a sensibilidade dos microrganismos à fagocitose [16–19]. Sendo assim, a ozonioterapia tem demonstrado possuir propriedades potenciais para a prática clínica odontológica [21].

Na odontologia, embora possamos observar trabalhos de pesquisas *in vivo* que envolvam a ozonioterapia em andamento e com bom prognóstico, sua utilização ainda requer estudos científicos mais aprofundados, com ensaios padronizados a fim de delinear seu real papel nos processos curativos e/ou regenerativos. O uso do ozônio consiste em uma indústria em crescimento com potencial em muitas áreas e sua utilização sem dúvida aumentará se os estudos continuarem a mostrar resultados

positivos, assim poderemos utilizar com mais convicção dos resultados e menor risco aos pacientes [19,21].

Diante do que foi exposto, pesquisas que envolvam a ozonioterapia no auxílio do reparo ósseo em associação com biomateriais como as membranas biológicas, ainda são muito escassos na literatura. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o possível benefício da utilização da ozonioterapia sistêmica em conjunto com uma membrana reabsorvível de colágeno porcino na regeneração óssea guiada.

2 OBJETIVO

Avaliar e mensurar o possível benefício da ozonioterapia em defeitos ósseos críticos, na regeneração óssea guiada.

A hipótese nula do trabalho foi que os grupos tratados ou não com a ozonioterapia, não apresentariam diferenças no reparo ósseo.

3 MATERIAL E MÉTODO

Desenho Experimental

Essa pesquisa seguiu todos os preceitos e princípios éticos para experimentação animal, regulamentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os protocolos experimentais foram enviados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pelo número de protocolo FOA nº 0292-2021 (Anexo A) e seguindo as orientações do ARRIVE Guidelines (Anexo B).

Seleção da amostra

Para esse estudo foram utilizados um total de 96 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em quatro grupos (n=6 por grupo), de maneira randomizada pelo método de sorteio manual, submetidos à eutanásia em quatro períodos experimentais: aos 7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia. O tamanho da amostra foi calculado usando o programa SigmaPlot 12.0 (exact graphs and data analysis, Sant Rose, USA). Para isso, utilizou-se um artigo publicado, no qual a diferença mínima das médias de porcentagem para neoformação óssea era 18,9; desvio padrão esperado de 8,1; para um Power Test = 80% e $p > 0,005$, seriam necessárias cinco amostras para cada grupo experimental [24]. Portanto, levando em consideração a possibilidade de perda de algum animal durante o experimento, o n=6 por grupo foi escolhido.

Estes animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba – UNESP em gaiolas, contendo três animais em cada uma, as quais eram limpas a cada dois dias, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum*. Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico de 8 mm de diâmetro [40] na calvária, como descrito a seguir:

- **Grupo membrana de colágeno porcino (BioGide®) (Controle Positivo) (BIO)** – n=24: somado ao coágulo que preenchia o defeito ósseo crítico foi utilizada apenas uma membrana de colágeno porcino (Bio-Gide®), já estabelecida como padrão ouro nesses modelos experimentais, sendo que 6 animais foram eutanasiados em cada tempo experimental (7, 15, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico);
- **Grupo membrana de colágeno porcino associada a ozonioterapia (Grupo Experimental 1) (BIO+OZ)** – n=24: recebeu a mesma terapia padrão ouro (Bio-Gide®) adicionado da ozonioterapia (intraperitoneal 0,7ml/kg) de 02 em 02 dias pós-operatórios, sendo que 6 animais foram eutanasiados em cada tempo experimental (7, 15, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico);
- **Grupo coágulo associado à ozonioterapia (Grupo Experimental 2) (COA+OZ)** – n=24: somado ao coágulo que preenchia o defeito ósseo crítico, os animais receberam a ozonioterapia sistêmica como terapia auxiliar (intraperitoneal 0,7ml/kg) de 02 em 02 dias pós-operatórios, sendo que 6 animais foram eutanasiados em cada tempo experimental (7, 15, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico);
- **Grupo coágulo (Controle Negativo) (COA)** – n=24: o defeito crítico (DC) foi preenchido apenas com a presença do coágulo sanguíneo.

Cirurgia Experimental

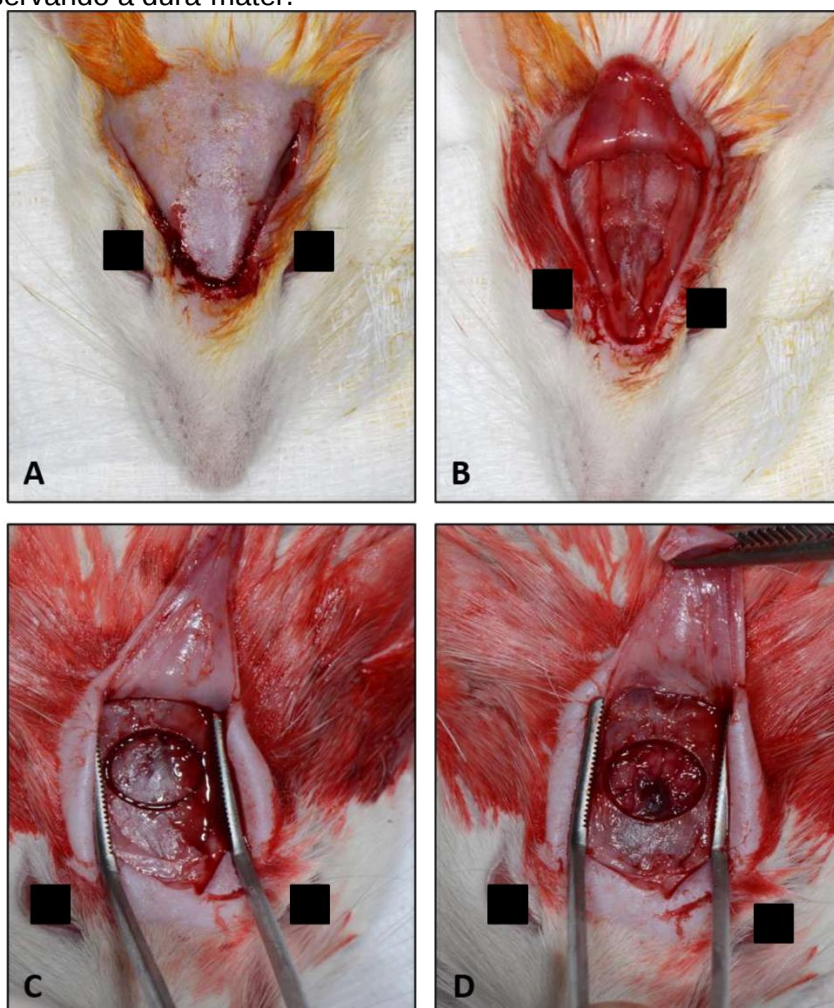
Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 12 horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente [25–27]. Um rigoroso protocolo asséptico foi adotado, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis e uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia

de Araçatuba – UNESP. Em seguida, a tricotomia na região da calvária foi realizada, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Confecção do defeito crítico na calota

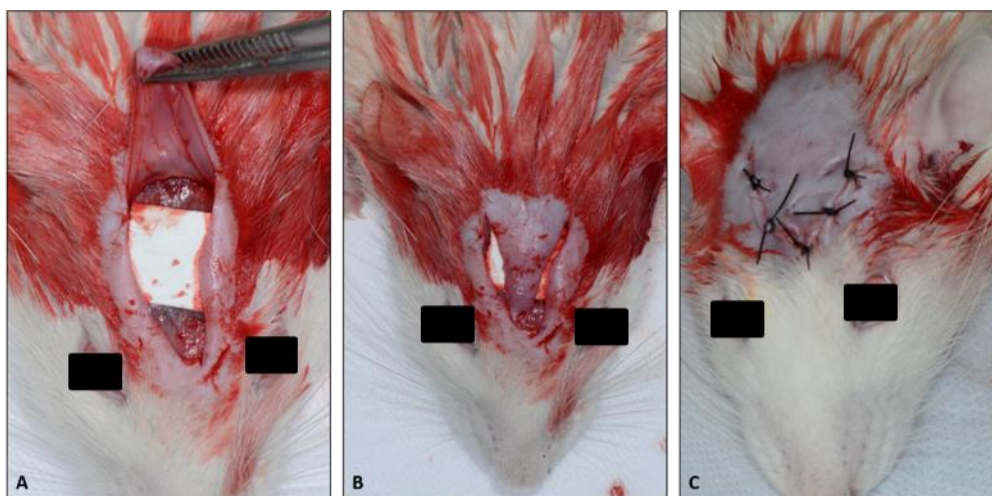
Uma incisão em forma de V no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha), foi executada (Figura 1A) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha) (Figura 1B). Em seguida, com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), confeccionou-se um defeito cirúrgico crítico de 8 mm de diâmetro externo na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 1C e D).

Figura 1. Cirurgia experimental realizada em calota, após a antissepsia da região. A: tricotomia e incisão em V no sentido occipito-frontal; B: calvária exposta após descolamento total do retalho; C: marcação do defeito de 8 mm a ser criado e D: defeito crítico de 8 mm realizado preservando a dura-máter.



De acordo com os tratamentos propostos, os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado a membrana nos determinados grupos (Figura 2A). No final do procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados (Figura 2B) e suturados em planos, empregando-se fio reabsorvível (ácido poliglactina 910– Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo (Figura 2C).

Figura 2. Instalação da membrana de colágeno porcino sobre o defeito ósseo crítico. A: membrana BioGide® colocada em posição; B: tecidos moles reposicionados; C: sutura interrompida simples com fio Nylon 5.0.



No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

Padrão de Aplicação da Ozonioterapia

Os animais correspondentes aos grupos **BIO+OZ** e **COA+OZ**, receberam a aplicação do ozônio por via intraperitoneal, na dosagem de 0,7ml/kg do animal, valor esse já estabelecido em outros estudos e publicações [15]. As aplicações ocorreram de 02 em 02 dias pós-operatórios, com início no pós-operatório imediato, com auxílio de uma máquina de ozônio gasoso fornecido pela empresa Ozone & Life (Ozone & Life Indústria, Comércio e Sistemas LTDA). Os animais dos demais grupos, que não passaram pela terapia com ozônio, foram submetidos a punção com agulha idêntica da terapia, visando mimetizar o estresse em todos os animais da pesquisa.

Figura 3. Aplicação do ozônio via intraperitoneal na dosagem de 0,7 ml/kg.



Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada por dose excessiva de anestésico nos respectivos tempos experimentais [25–27]. Como critério de exclusão, estabeleceu-se que qualquer complicação cirúrgica trans ou pós-operatória excluía a amostra das avaliações.

Coleta, Fixação e Processamento das Peças

As calvárias dos animais, obtidas nos períodos de eutanásia de 7, 15 e 30 dias, foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando o defeito ósseo (Figura 4). As peças obtidas foram incluídas em parafina, e cortadas em cortes semiseriados de 6µm de espessura. De cada peça, 10 lâminas foram obtidas, as quais foram destinadas à coloração em hematoxilina e eosina (H&E) para a confecção das análises histológicas e histomorfométricas (Figura 5). Apenas no período de eutanásia de 60 dias, as peças, após serem fixadas em formaldeído 10% durante 48 horas e lavadas em água corrente por 24 horas, foram mantidas em álcool 70%, analisadas no sistema de Micro-TC Skyscan 1272 (Bruker, Kontich, Belgium) e, posteriormente,

tratadas da mesma maneira que as outras peças, obtendo-se as lâminas com a coloração de H&E.

Figura 4. Corte longitudinal obedecendo a margem de segurança ao redor de todo o defeito, separando-o ao meio para inclusão em parafina.

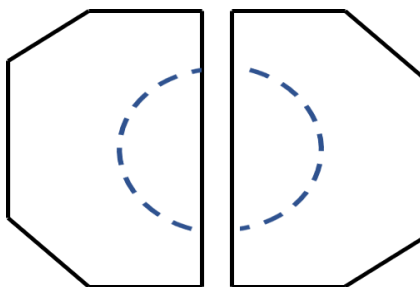


Figura 5. Cortes representativos de 6 µm de espessura de cada bloco de parafina já montados em lâminas



Análises Histológica e Histomorfométrica

Previamente à realização da análise histométrica, as amostras foram codificadas de maneira que somente a orientadora sabia a quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises.

Após a obtenção das lâminas, em um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) conectada a um computador com o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), foram realizadas as fotomicrografias em um aumento de 4x para a reconstrução panorâmica e análise da quantidade de osso neoformado (objetivo primário) e fotomicrografias nos aumentos de 40x e 100x para a realização da descrição histológica.

Análise de Perfil Inflamatório

O perfil inflamatório das peças foi realizado a partir da quantificação de células inflamatórias (linfócitos) e vasos sanguíneos. Para isso, foram realizadas fotomicrografias em um aumento de 100x, das quais 3 imagens eram realizadas por secção histológica: a primeira, ao centro do defeito; a segunda, à direita; e a terceira, à esquerda; sendo que 2 secções histológicas por animal foram escolhidas das amostras obtidas nos tempos experimentais de 7 e 15 dias para os grupos **BIO**, **BIO+OZ**, **COA+OZ** e **COA**, totalizando 96 imagens. Após a obtenção das imagens, no software Image J, uma grade contendo 130 pontos foi inserida em cada imagem, e cada célula com característica linfocitária (mononucleares) que tocasse o ponto era contada; para os vasos sanguíneos, o conjunto de pontos inseridos dentro do mesmo vaso era quantificado.

Análise por MicroCt

Após a fixação das calvárias em formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, os espécimes obtidos no período de eutanásia de 60 dias, foram mantidos em álcool 70%, e submetidos à avaliação em microtomógrafo computadorizado Skyscan 1272 (Bruker, Kontich, Belgium). Os parâmetros utilizados foram: tamanho do pixel 11,87 μm , 50 kVp, filtro de 0,5mm de alumínio, rotação 0.6° e rotação do arco de 180°.

Após a digitalização, as imagens obtidas foram importadas para o NRecon Reconstruction Software (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) para a reconstrução tridimensional (3D) das calvárias na escala de cinza, na qual as linhas vermelhas delimitam a área a ser reconstruída e a linha verde o centro da região de interesse. Após a obtenção das imagens em 3D, o Software DataViewer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) foi utilizado para a determinação do volume de interesse (VOI), que foi padronizado para todas as imagens, sendo que todos foram salvos em uma visão coronal.

Os cortes obtidos foram importados para o Software CT-Analyzer (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Nas imagens obtidas, foram avaliados parâmetros

morfométricos como volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.th), número de trabéculas ósseas (Tb.N), separação do trabeculado (Tb.Sp) e porcentagem da porosidade óssea total (Po.tot) (Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Para a determinação da região de interesse (ROI) foi utilizada a ferramenta Round devido a morfologia arredondada dos defeitos, sendo essa também padronizada para todas as reconstruções (9,74x9,74). Logo após, foi utilizado um limite da escala de cinza de 181 a 24 em um intervalo de 100 camadas. As imagens foram então convertidas para a escala de cinza para o cálculo dos parâmetros tridimensionais em milímetros (mm), realizado pelo próprio software.

Análises Estatísticas

Os dados obtidos durante as análises histomorfométricas e de MicroCt foram submetidos a um teste de normalidade para avaliação da distribuição das amostras (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). Após a confirmação da distribuição normal das amostras, para as análises histomorfométricas, o teste estatístico ANOVA 2-fatores e o pós-teste de Tukey foram utilizados para a comparação das médias obtidas. Para as análises de MicroCt, o teste estatístico ANOVA 1-fator e o pós teste Holm-Sidak foram utilizados para a comparação das médias obtidas. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

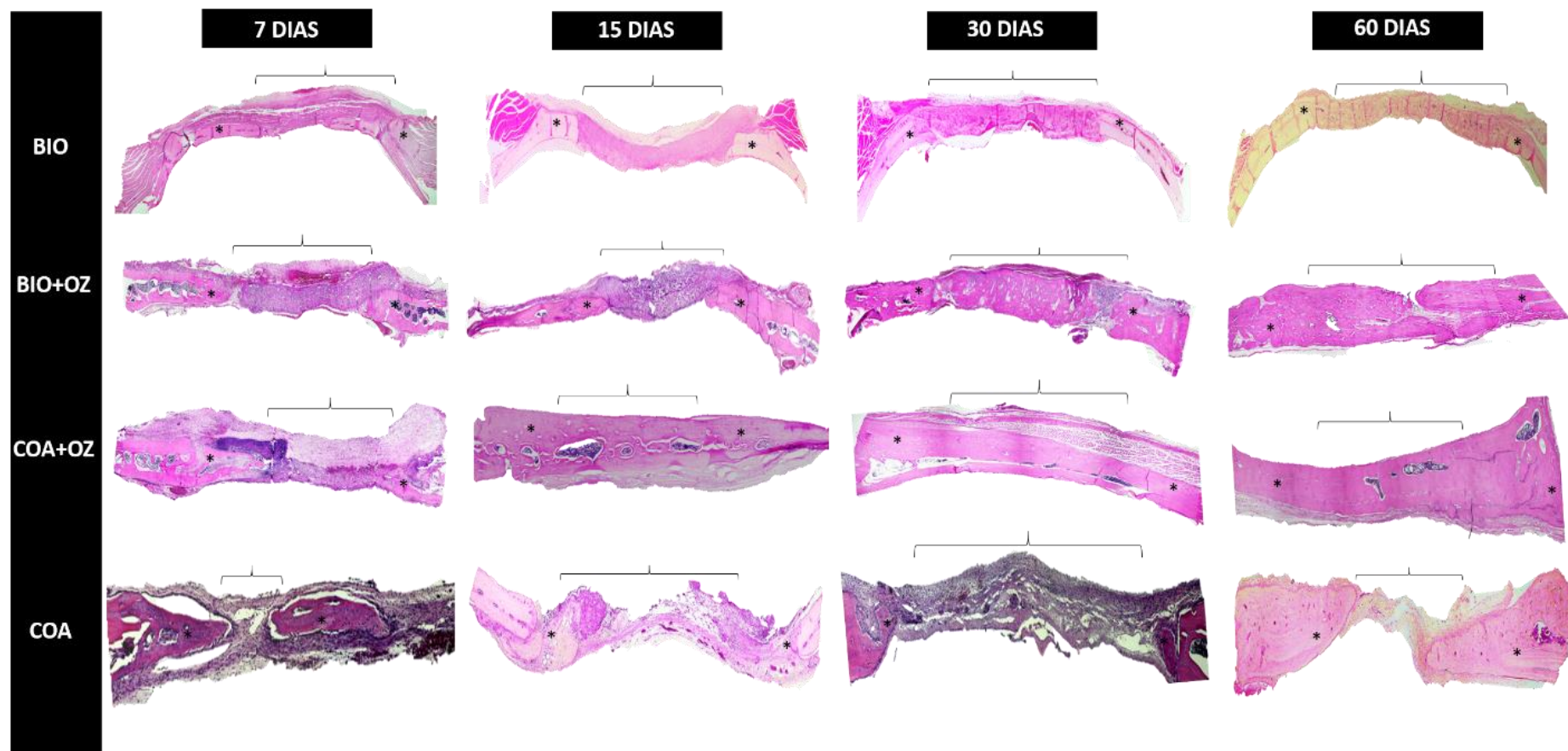
4 RESULTADOS

Dentre as amostras, não foram observadas complicações durante o procedimento cirúrgico e todos os animais sobreviveram ao pós-operatório, permitindo a inclusão de todos no trabalho.

4.1 Avaliação Histológica (morfologia)

A descrição histológica foi realizada a partir das reconstruções panorâmicas das fotomicrografias realizadas em um aumento de 4.0x e a confirmação das estruturas encontradas nos maiores aumentos (Figura 6).

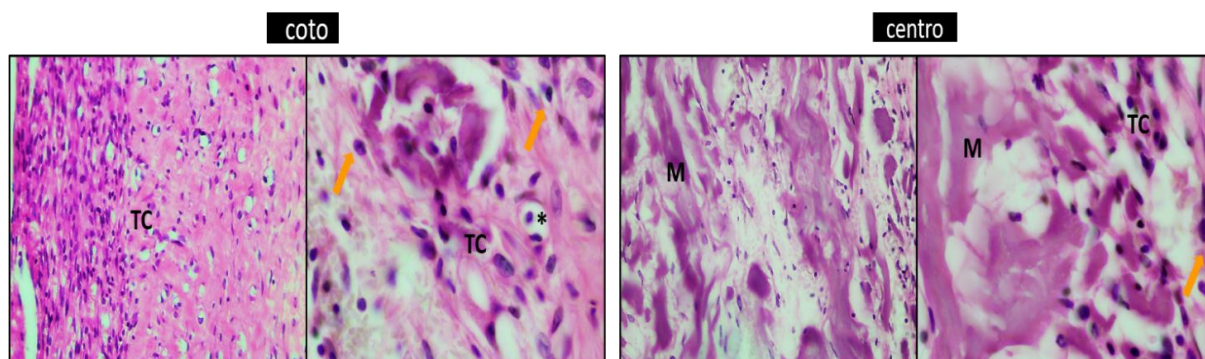
Figura 6. Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias dos grupos BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA em todos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias em um aumento de 4.0x. O defeito crítico de 8 mm de diâmetro externo, está delimitado pelo { } e os * indicam os cotos ósseos.



Grupo BioGide® (BIO)

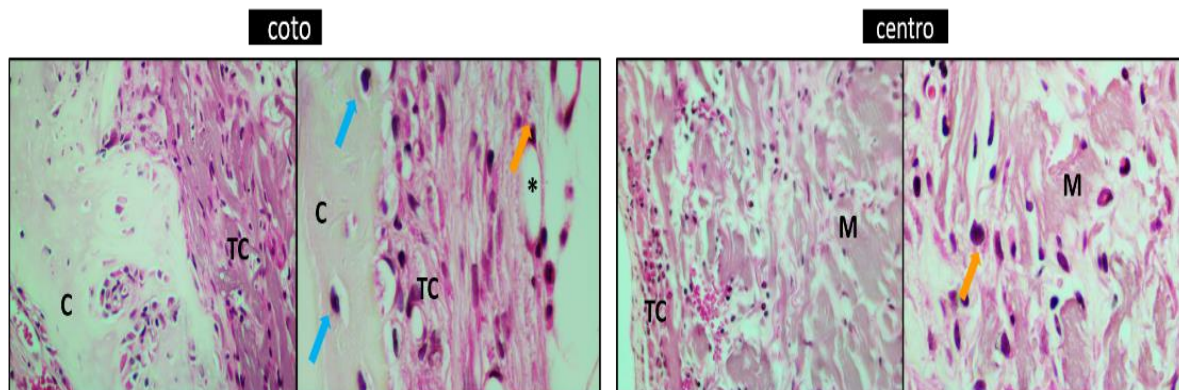
7 dias: É possível observar na reconstrução panorâmica em um aumento de 4.0x, a presença da membrana de colágeno porcino íntegra recobrindo toda a extensão do defeito ósseo e a presença de tecido conjuntivo frouxo bem organizado (figura 6). No aumento de 40x, no centro do defeito, verifica-se um tecido de granulação jovem e altamente vascularizado, sem infiltrado inflamatório. No aumento de 100x pode-se notar as duas camadas que compõe a membrana de colágeno e uma invasão celular no interior da membrana (Figura 7).

Figura 7. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO aos 7 dias magnificações de 40x e 100x. Na região dos cotos observa-se a presença de um tecido conjuntivo (TC) rico em fibroblastos (setas amarelas). No centro do defeito, nota-se um tecido conjuntivo (TC) rico em células e a nítida presença da membrana (M) de colágeno porcino.



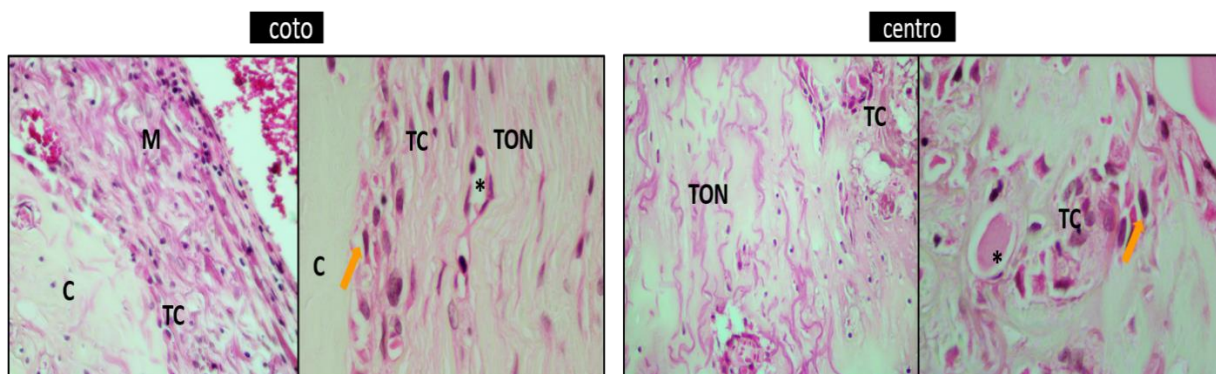
15 dias: A imagem panorâmica revela o início de uma neoformação óssea a partir dos cotos em direção ao centro do defeito ósseo, a presença da membrana mantendo o espaço do defeito. Na avaliação dos maiores aumentos, de 40x e 100x, observa-se que existe um tecido conjuntivo mais denso, com menor quantidade de células linfocitárias e maior quantidade de fibras, sendo que essas fibras estão dispostas em uma única direção. No interior da membrana pode-se observar células e vasos sanguíneos e uma maior neoformação óssea quando comparado ao período de 7 dias (Figura 8).

Figura 8. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível notar o início do processo de neoformação óssea (as setas azuis indicam as células osteoprogenitoras), envolto por tecido conjuntivo (TC) bem vascularizado (os * indicam os vasos sanguíneos), e as setas amarelas os fibroblastos. No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito, bem celularizado.



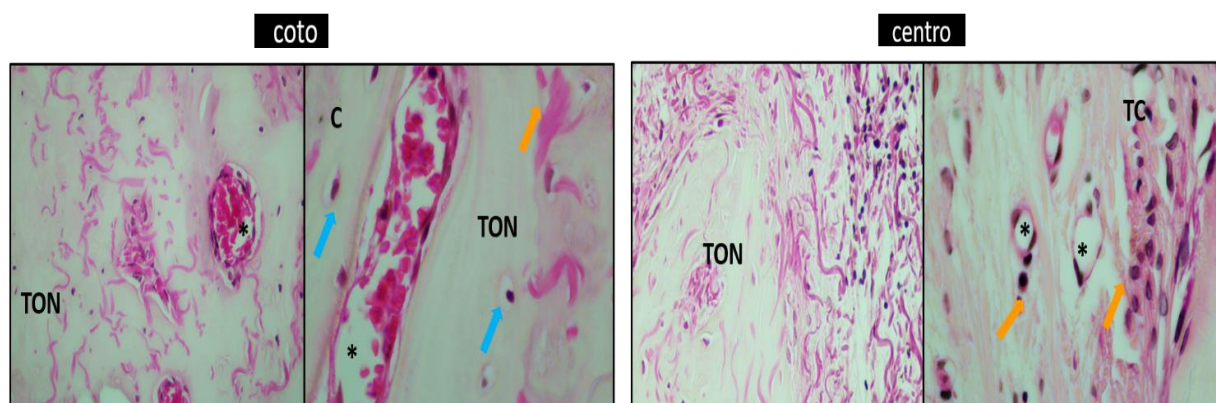
30 dias: Na reconstrução panorâmica é possível observar maior neoformação óssea entremeada por fragmentos da membrana de colágeno porcino. Nota-se a presença de periósteo e tecido ósseo neoformado tanto a partir dos cotos, como no centro do defeito. As imagens em maior aumento mostram a presença da membrana, entretanto mais fragmentada em comparação com os períodos de 7 e 15 dias, além de fibras colágenas organizadas e dispostas na mesma direção. Verifica-se grande quantidade de vasos, fibras que compõe a membrana de colágeno com tecido ósseo ao seu redor e ausência de infiltrado inflamatório. Em alguns espécimes foi possível observar o fechamento total do defeito ósseo (Figura 9).

Figura 9. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível notar o início do processo de neoformação óssea (TON), envolto por tecido conjuntivo (TC) bem celularizado (as setas amarelas indicam os linfócitos e os * indicam os vasos sanguíneos). No centro do defeito nota-se o tecido ósseo neoformado (TON) envolto por tecido conjuntivo.



60 dias: A imagem panorâmica (aumento de 4.0x) mostra grande neoformação óssea e o fechamento quase completo do defeito ósseo crítico. Pode-se observar que ainda existem fragmentos da membrana de colágeno porcino e tecido conjuntivo denso (Figura 6). Observando as imagens de maior magnitude, de 40x e 100x nota-se que o tecido ósseo neoformado se encontra mais maduro em relação ao período de 30 dias (Figura 10).

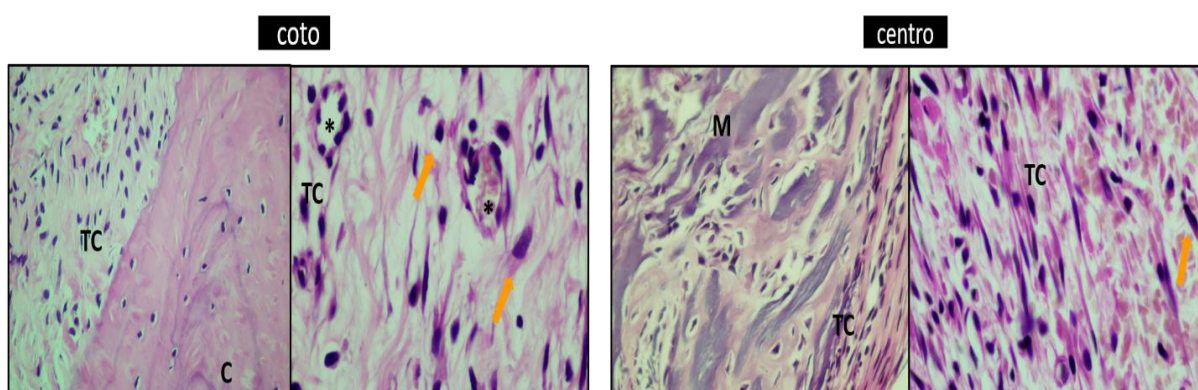
Figura 10. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. É possível observar tanto a partir dos cotos, como no centro do defeito uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado (TON) com a presença de grandes vasos sanguíneos (*) e células osteoprogenitoras (seta azul) em toda a extensão do defeito.



Grupo BioGide®+Ozônio (BIO+OZ)

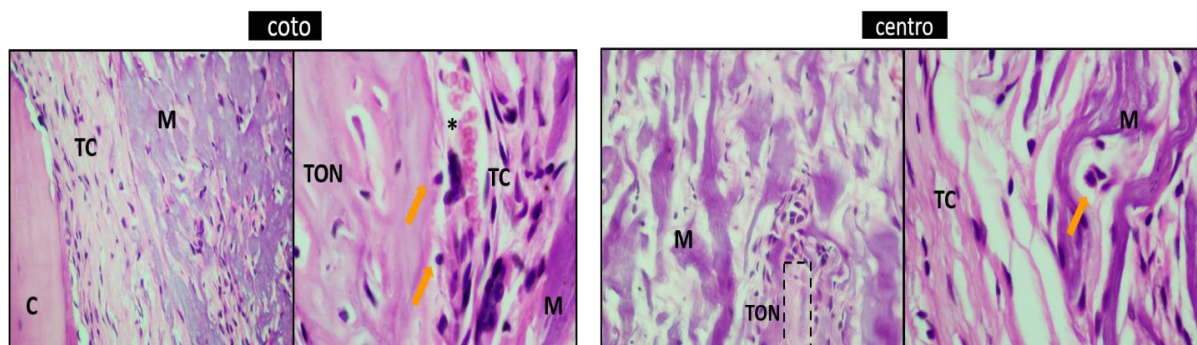
7 dias: Na imagem panorâmica (aumento de 4.0x) observamos a membrana de colágeno porcino recobrindo toda a extensão do defeito ósseo e a presença de tecido conjuntivo frouxo (Figura 6). As imagens de maior aumento (40x e 100x) revelam a presença de fibras colágenas dispostas de forma paralela e mais organizadas em relação ao grupo que recebeu apenas a membrana de colágeno porcino (BIO). É possível observar a presença de muitos vasos sanguíneos, fibroblastos mais orientados e um tecido de granulação mais avançado no processo de reparo, além da ausência de infiltrado inflamatório (Figura 11).

Figura 11. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO+OZ aos 7 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível um tecido conjuntivo (TC) bem vascularizado (os * indicam os vasos sanguíneos e as setas amarelas indicam os fibroblastos). No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito, que está preenchido por um tecido conjuntivo (TC) com fibroblastos mais orientados.



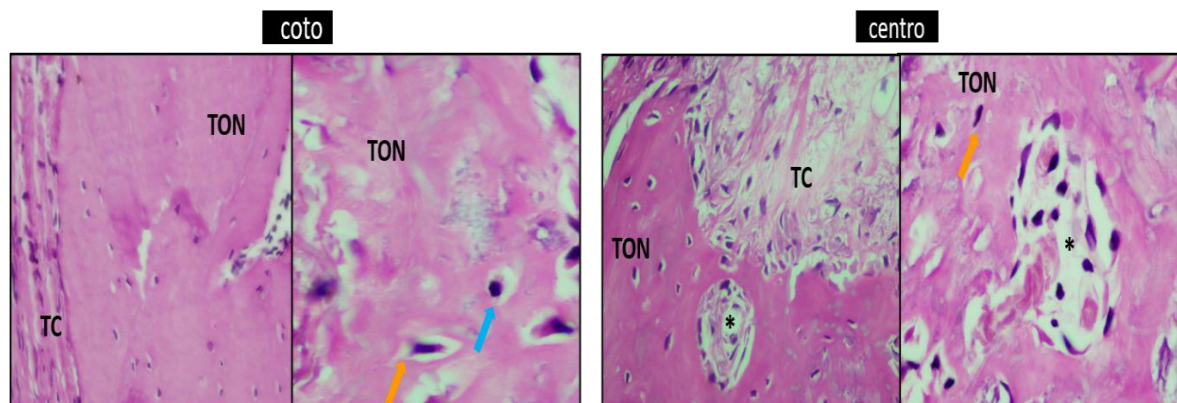
15 dias: A reconstrução panorâmica (aumento de 4.0x) mostra que ocorreu um avanço no processo de neoformação óssea que se inicia a partir dos cotos em direção ao centro do defeito, e que a membrana continua íntegra e em posição (Figura 6). Nos aumentos de maior magnitude (40x e 100x) pode-se observar de forma mais detalhada a presença de tecido conjuntivo maduro e bem vascularizado, ilhas de neoformação óssea no centro do defeito e invadindo a membrana de colágeno porcino.

Figura 12. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO+OZ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível notar o início do processo de neoformação óssea (TON) em direção ao centro do defeito, além da presença de um tecido conjuntivo (TC) maduro, com vasos sanguíneos grandes e fibroblastos (setas amarelas) orientados. No centro do defeito a membrana (M) aparece de maneira íntegra envolvendo todo o defeito, com ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) ao seu redor.



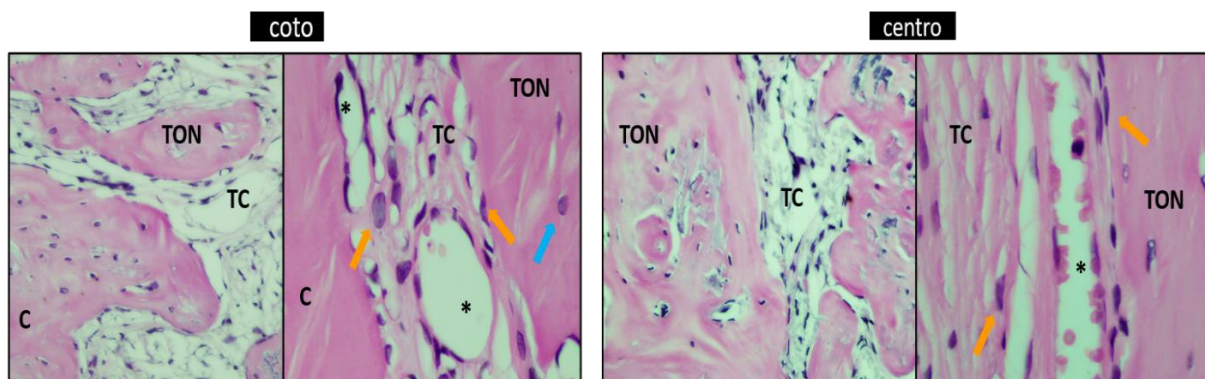
30 dias: No aumento de 4.0x pode-se observar neoformação óssea a partir dos cotos em direção ao centro do defeito e a presença de um tecido de granulação bem organizado (Figura 6). Os aumentos de 40x e 100x revelam que aos 30 dias a membrana não cumpre mais sua função de barreira visto que se iniciou o processo de degradação, restando apenas alguns fragmentos. É possível verificar a existência de tecido conjuntivo fibroso, osteoblastos na região periférica do defeito e osteócitos no interior do tecido ósseo neoformado, tanto a partir dos cotos como no centro do defeito (Figura 13).

Figura 13. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO+OZ aos 30 dias nas magnificações de 40x e 100x. Na região dos cotos nota-se tecido ósseo neoformado (TON) significativo, bem celularizado com alguns fibroblastos (setas amarelas) e células osteoprogenitoras na superfície (seta azul). No centro do defeito é possível observar tecido ósseo neoformado (TON) em toda a extensão, com grandes vasos sanguíneos (*) e algumas áreas de tecido conjuntivo (TC) maduro, com fibroblastos e fibroblastos bem organizados.



60 dias: A reconstrução panorâmica (aumento de 4.0x) mostra grande quantidade de tecido ósseo neoformado tanto a partir dos cotos, como no centro do defeito sendo que a maioria dos espécimes obteve o completo fechamento do defeito ósseo (Figura 6). Nos aumentos de maior magnitude (40x e 100x) é notória a presença de um tecido ósseo mais maduro, já em fase de remodelação, além da aparição de osteoblastos, osteócitos e células gigantes. O processo de degradação da membrana de colágeno porcino se encontra avançado, não sendo possível observar quase nenhum fragmento (Figura 14).

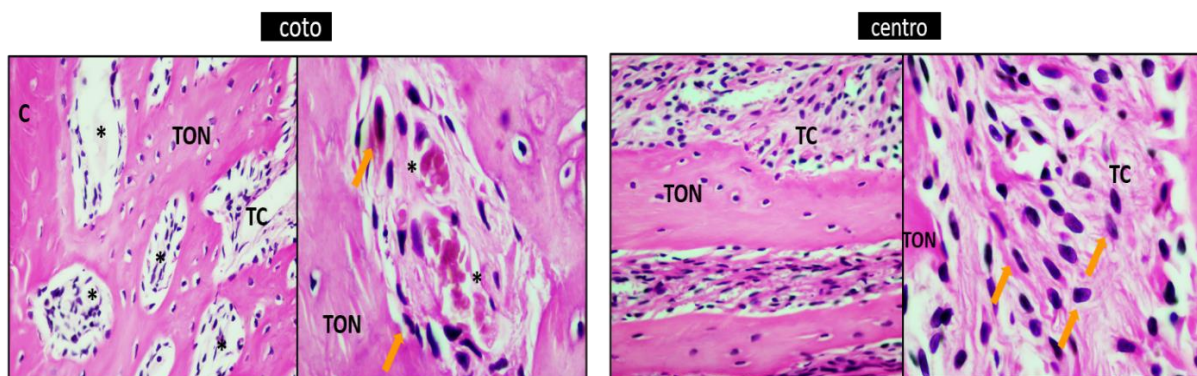
Figura 14. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo BIO+OZ aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Próximo aos cotos (C), é possível notar o processo de neoformação óssea, com ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) mais maduro, com células osteoprogenitoras (seta azul), envolto por um tecido conjuntivo (TC) denso, com vasos sanguíneos de grande calibre (*) e fibroblastos (setas amarelas). No centro, nota-se tecido ósseo (TON) em toda a extensão e algumas áreas de tecido conjuntivo (TC) com fibras colágenas bem organizadas.



Grupo Coágulo+Ozônio (COA+OZ)

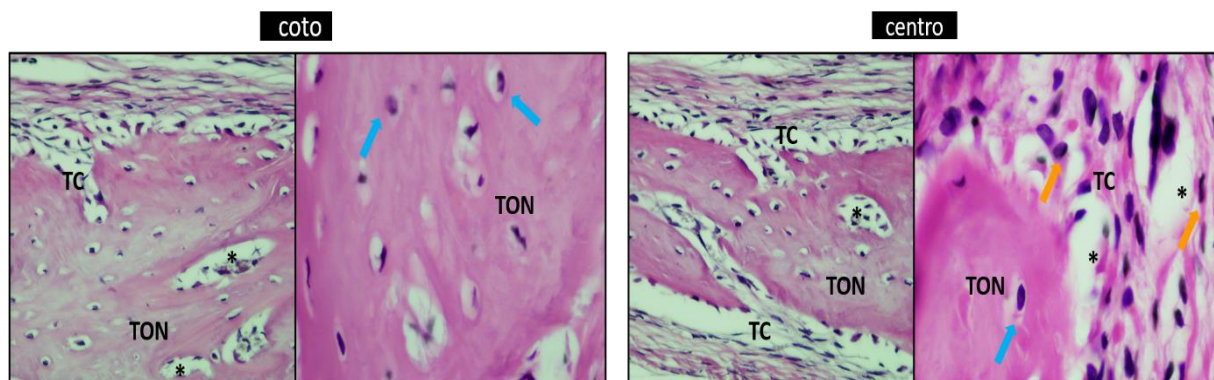
7 dias: A imagem panorâmica (aumento de 4.0x) permite verificar a presença de um tecido de granulação muito vascularizado e o início do processo de regeneração óssea dos cotos em direção ao centro do defeito (Figura 6). Nos aumentos de maior magnitude (40x e 100x) nota-se que existe um tecido conjuntivo fibroso entremeado por neoformação óssea, áreas com tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos, atividade fibroblástica, células gigantes e osteoblastos próximos aos vasos (Figura 15).

Figura 15. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA+OZ aos dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Na área dos cotos (C) nota-se algumas ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) em direção ao centro, envoltas por tecido conjuntivo (TC) muito vascularizado, com vasos sanguíneos de grande calibre (*) e fibroblastos ao redor (setas amarelas). No centro do defeito observa-se atividade fibroblástica intensa (setas amarelas, tecido conjuntivo (TC) frouxo e pequenas ilhas de tecido ósseo neoformado (TON).



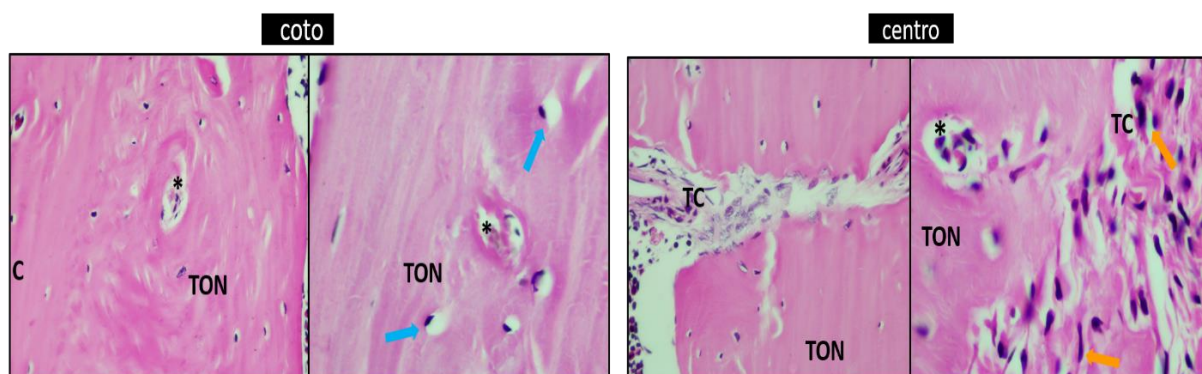
15 dias: Pode-se observar na imagem panorâmica (aumento de 4.0x) um avanço bem significativo do processo de regeneração óssea a partir dos cotos em direção ao centro do defeito (Figura 6). Nos maiores aumentos (40x e 100x) nota-se que o tecido conjuntivo se encontra bem organizado assim como as fibras colágenas que se encontram dispostas de forma paralela entre si (Figura 16).

Figura 16. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA+OZ aos 15 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Na região dos cotos nota-se ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) que se direcionam para o centro do defeito e um tecido conjuntivo (TC) denso e organizado. No centro do defeito é possível notar tecido ósseo neoformado (TON) significativo e tecido conjuntivo (TC) com intensa atividade fibroblástica e muitos vasos sanguíneos. Os (*) indicam os vasos sanguíneos, as setas azuis as células osteoprogenitoras e as setas amarelas os fibroblastos.



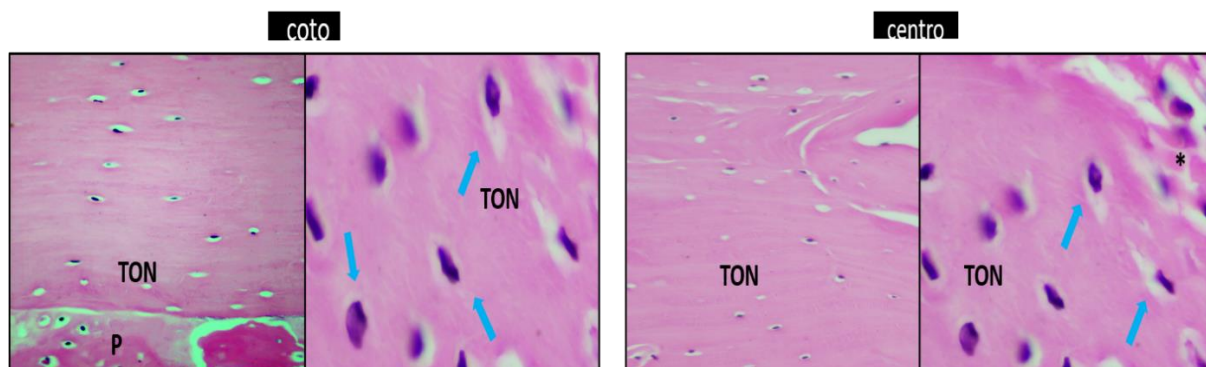
30 dias: A reconstrução panorâmica (aumento de 4.0x) revela defeitos ósseos totalmente fechados na maioria dos espécimes e a presença de tecido conjuntivo fibroso bem organizado (Figura 6). Os aumentos de maior magnitude (40x e 100x) mostram ausência de infiltrado inflamatório, grande quantidade de tecido ósseo neoformado, além da presença de periósteo (Figura 17).

Figura 17. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA+OZ aos 30 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Na área dos cotos (C) nota-se grande quantidade de tecido ósseo neoformado (TON) com alguns osteoblastos (setas azuis) e alguns vasos sanguíneos (*). No centro do defeito, é possível notar tecido ósseo neoformado (TON) em toda a extensão, com algumas áreas de tecido conjuntivo (TC) fibroso, organizado, com vasos sanguíneos (*) e fibroblastos (setas amarelas).



60 dias: Na reconstrução panorâmica (aumento de 4.0x) é notória a presença de uma grande neoformação óssea recobrendo totalmente o defeito (Figura 6). Nos maiores aumentos (40x e 100x) é possível observar um tecido ósseo com linhas de reversão, já entrando em fase de remodelação e ausência de infiltrado inflamatório (Figura 18).

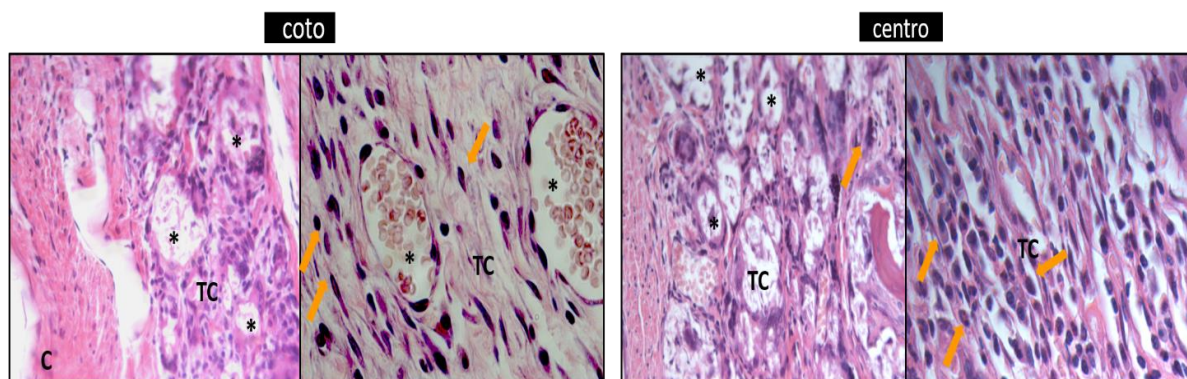
Figura 18. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA+OZ aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. A região de coto ósseo se confunde com a área total de tecido ósseo neoformado (TON), sendo possível observar tecido ósseo ativo pela presença de osteócitos viáveis (setas azuis). No centro do defeito, grande área de tecido ósseo neoformado (TON) é observada, garantindo o fechamento total do defeito.



Grupo Coágulo (COA):

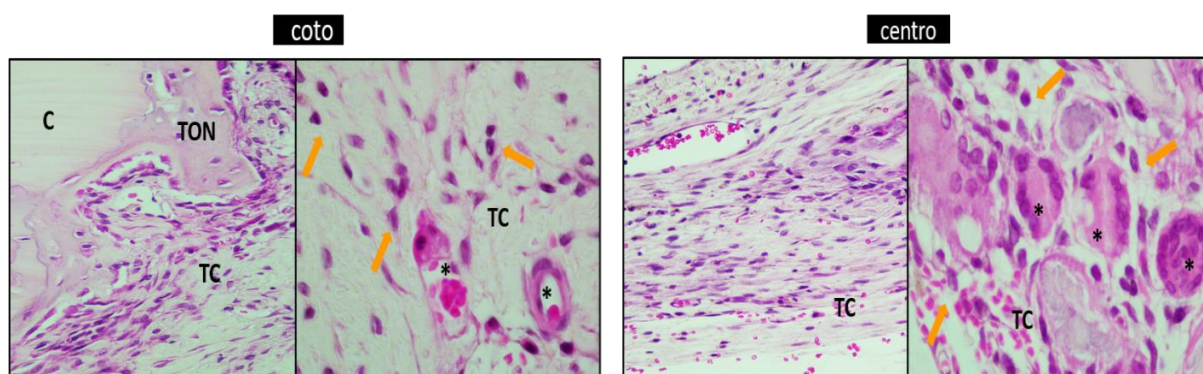
7 dias: Na imagem panorâmica, observa-se a ferida cirúrgica preenchida por um tecido de granulação (Figura 6). Na borda do defeito existe neoformação óssea, com tecido ósseo primário e aleatoriamente distribuído, ricamente celularizado por osteócitos e recoberto em suas superfícies por osteoblastos. A neoformação óssea foi notada nos cotos da ferida cirúrgica, sendo ausente na região central, com abundante tecido de granulação jovem, contendo macrófagos, neoformação vascular, fibroblastos e pouca matriz extracelular preenchendo a região central do defeito (Figura 19).

Figura 19. Fotomicrografias da região do centro do defeito do grupo COA aos 7 dias de reparo nas magnificações de 40x e 100x. É possível notar grande quantidade de tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos de grande calibre, e intensa atividade fibroblástica (setas amarelas) tanto a partir dos cotos, como no centro do defeito.



15 dias: A imagem panorâmica (aumento de 4.0x) mostra que a neoformação óssea continua apenas nos cotos do defeito com tecido ósseo primário e que a região central está preenchida por tecido conjuntivo fibroso (Figura 6). Na avaliação das fotomicrografias dos aumentos de 40x e 100x foi possível constatar a presença de neoformação vascular e intensa atividade fibroblástica (Figura 20).

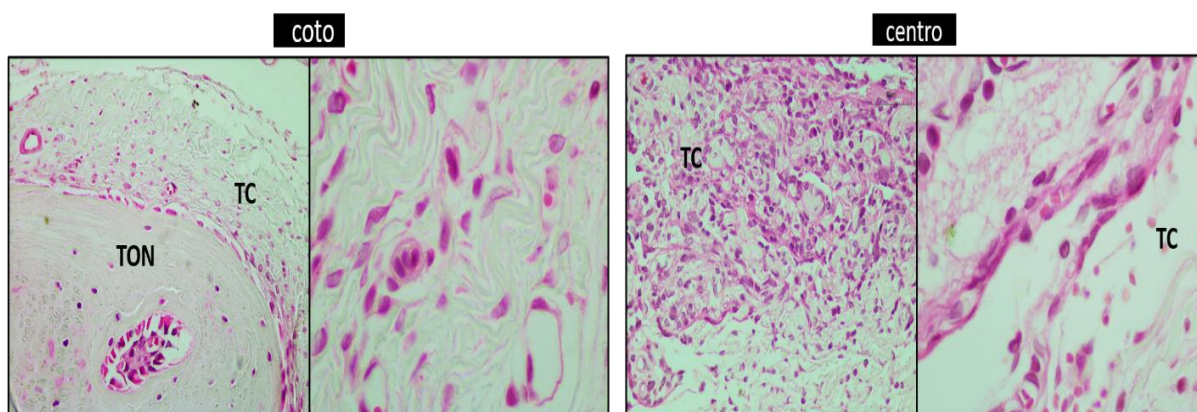
Figura 20. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA aos 60 dias de reparo ósseo nas magnificações de 40x e 100x. Nota-se a presença de pequenas ilhas de tecido ósseo neoformado (TON) somente na região dos cotos. Na região central existe um tecido conjuntivo (TC), neoformação vascular (*) e grande quantidade de células (setas amarelas) ao redor dos vasos e no interior do tecido de granulação.



30 dias: A reconstrução panorâmica (aumento de 4.0x) permite observar que houve um avanço do processo de regeneração óssea a partir dos cotos, entretanto o centro do defeito ainda está preenchido por tecido conjuntivo frouxo não modelado (Figura 6). Os maiores aumentos permitem verificar um tecido conjuntivo mais organizado com pequenas ilhas de neoformação óssea nas bordas do defeito e a presença de células osteoprogenitoras (Figura 21).

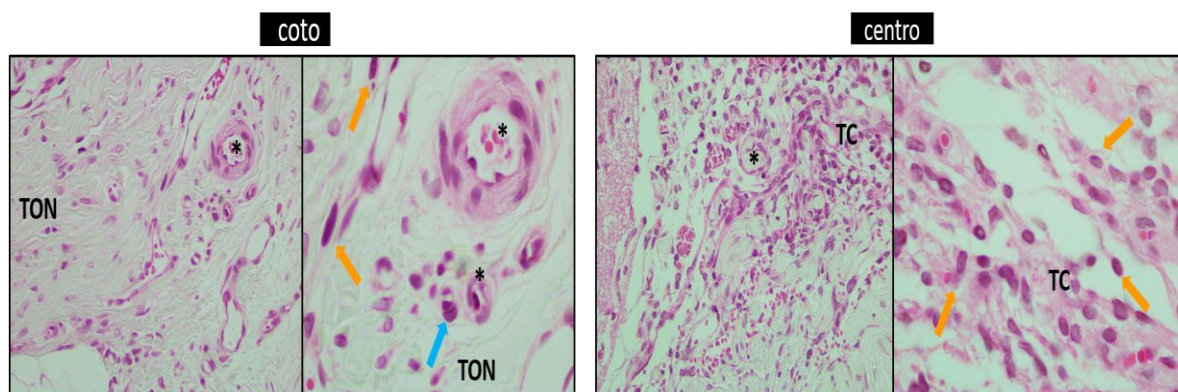
Figura 21. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA aos 30 dias de reparo nas magnificações de 40x e 100x. A área de tecido ósseo neoformado (TON) continua apenas na região de coto ósseo. Existe a presença de um tecido conjuntivo

(TC) fibroso, mais organizado, com grandes aglomerados celulares tanto nos cotos, como no centro do defeito.



60 dias: A imagem panorâmica (aumento de 4.0x) revela que o tecido ósseo neoformado na região dos cotos do defeito se apresenta mais maduro em relação aos 30 dias e existe tecido conjuntivo denso que preenche o centro da ferida cirúrgica (Figura 6). Nos aumentos de maior magnitude (40x e 100x) foi possível notar pequenas ilhas de neoformação óssea, presença de vasos sanguíneos, células gigantes e atividade fibroblástica intensa na região central (Figura 22).

Figura 22. Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito do grupo COA aos 60 dias de reparo nas magnificações de 40x e 100x. É possível observar tecido ósseo neoformado (TON) na região dos cotos em direção ao centro, além da presença de células osteoprogenitoras (seta azul) e fibroblastos (seta amarela). Tecido conjuntivo (TC) mais organizado, grandes vasos sanguíneos (*) e aglomerados celulares (setas amarelas) na região central do defeito ósseo.



4.2 Análises Histométricas

Os resultados obtidos, foram interpretados de maneira a traçar o perfil inflamatório e avaliar a capacidade osteopromotora de cada membrana testada em comparação com o controle positivo (BIO).

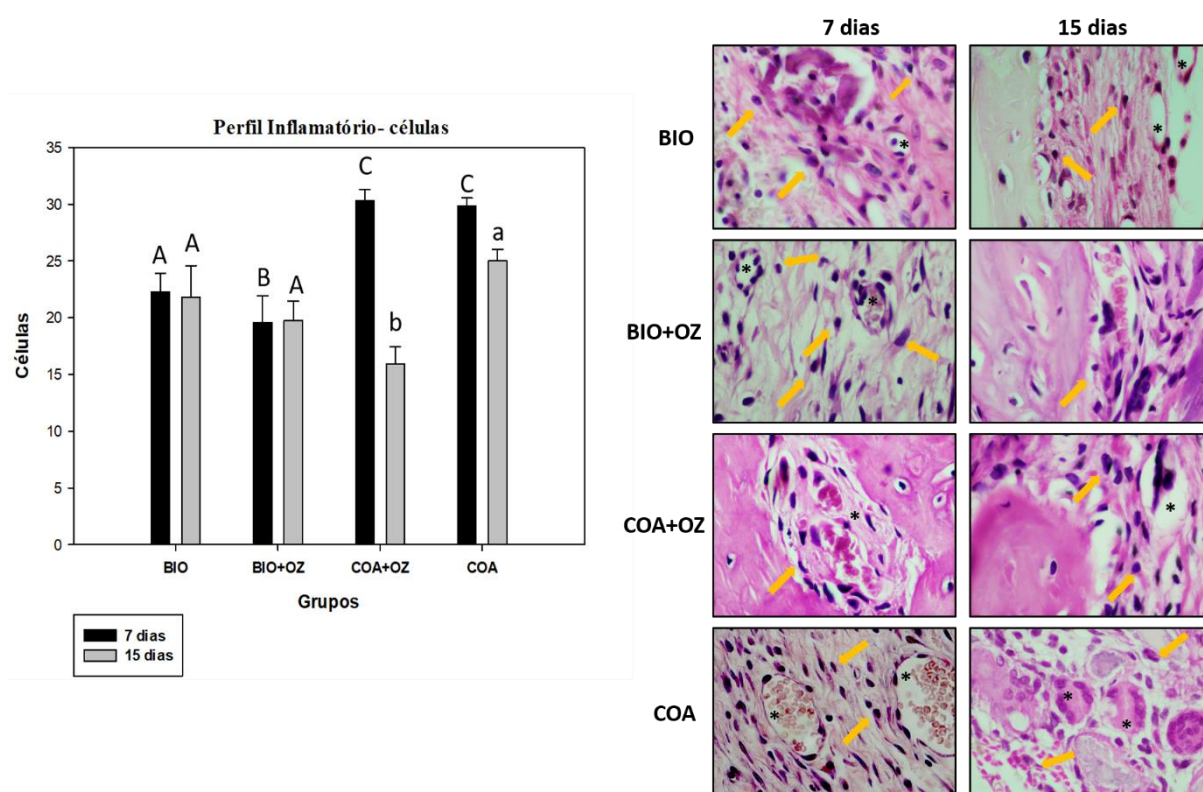
4.2.1 Perfil inflamatório (células e vasos sanguíneos)

Na avaliação intragrupos em relação a quantidade de células (linfócitos), foi possível observar diferenças estatísticas apenas nos grupos COA ($p < 0,05$) e COA+OZ ($p < 0,05$), sendo que ambos os grupos apresentaram menor conteúdo celular no período de 15 dias quando comparado ao período inicial de 7 dias.

Já na análise intergrupos, no período de 7 dias, o grupo COA+OZ ($p < 0,001$) apresentou a maior quantidade de células quando comparado aos grupos BIO ($p < 0,01$) e BIO+OZ ($p < 0,01$) com diferenças estatísticas significativas, ficando próximo apenas do grupo COA em que não foi observada diferença estatística significativa ($p = 0,992$). O grupo BIO+OZ foi o grupo que apresentou o menor conteúdo celular neste período, não apresentando diferenças estatísticas apenas em relação ao grupo BIO ($p = 0,196$).

Na análise intergrupos do período de 15 dias, o grupo COA ($p=0,09$) apresentou a maior quantidade de linfócitos, com diferenças estatísticas significativas em relação aos grupos BIO+OZ ($p<0,05$) e COA+OZ ($p<0,01$); já em comparação ao grupo BIO, não foi observada diferença estatística significativa ($p<0,05$), apesar do grupo que recebeu a membrana apresentar menor quantidade de células. Neste mesmo período, os grupos BIO e BIO+OZ também não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si ($p<0,05$).

Figura 23. Gráfico representativo das comparações das médias e desvio padrão inter e intragrupos para a análise de células inflamatórias (linfócitos) nos períodos de 7 e 15 dias. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas significantes intergrupos e as minúsculas demonstram se houve diferença estatística significativa intragrupo no período de 7 para 15 dias. As fotomicrografias ao lado foram realizadas em um aumento de 100x, as setas amarelas indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos.

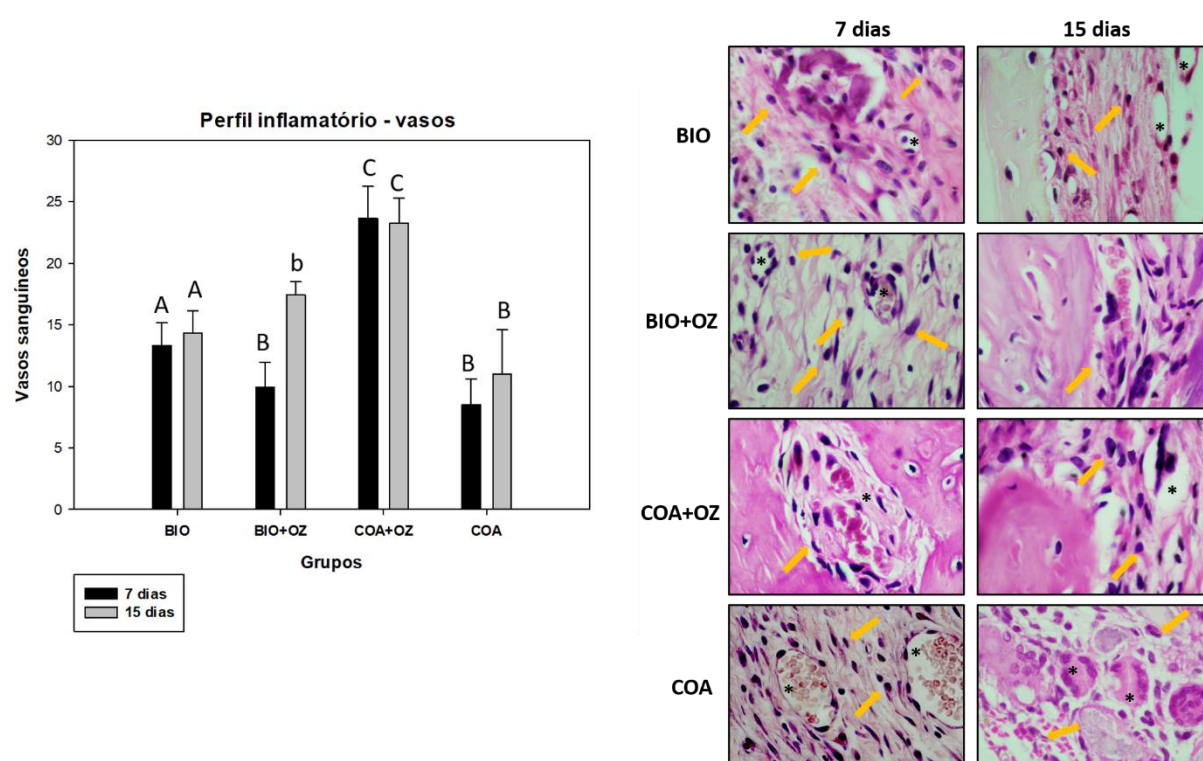


Em uma análise comparativa intragrupos em relação à quantidade de vasos sanguíneos presentes durante o processo de reparo, o grupo BIO+OZ ($p<0,05$) foi o único que apresentou diferença estatística significativa, demonstrando um aumento importante da quantidade de vasos no período de 7 para 15 dias.

Na avaliação da capacidade angiogênica intergrupos, tanto no período de 7 dias como no de 15 dias, o grupo COA+OZ despontou com a maior capacidade angiogênica em relação a todos os outros grupos, com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). O grupo COA foi o grupo que demonstrou menor capacidade angiogênica e ambos os períodos analisados, quando comparado os grupos BIO, BIO+OZ e COA+OZ ($p < 0,05$).

No período de 15 dias, apenas não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos BIO x COA ($p = 0,228$), e também entre os grupos BIO x BIO+OZ ($p = 0,220$).

Figura 24. Gráfico representativo das comparações das médias e desvio padrão inter e intragrupos para a análise da quantidade de vasos sanguíneos nos períodos de 7 e 15 dias. As letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas significantes intergrupos e as minúsculas demonstram se houve diferença estatística significativa intragrupo no período de 7 para 15 dias. As fotomicrografias ao lado foram realizadas em um aumento de 100x, as setas amarelas indicam as células (linfócitos) e os * os vasos sanguíneos.



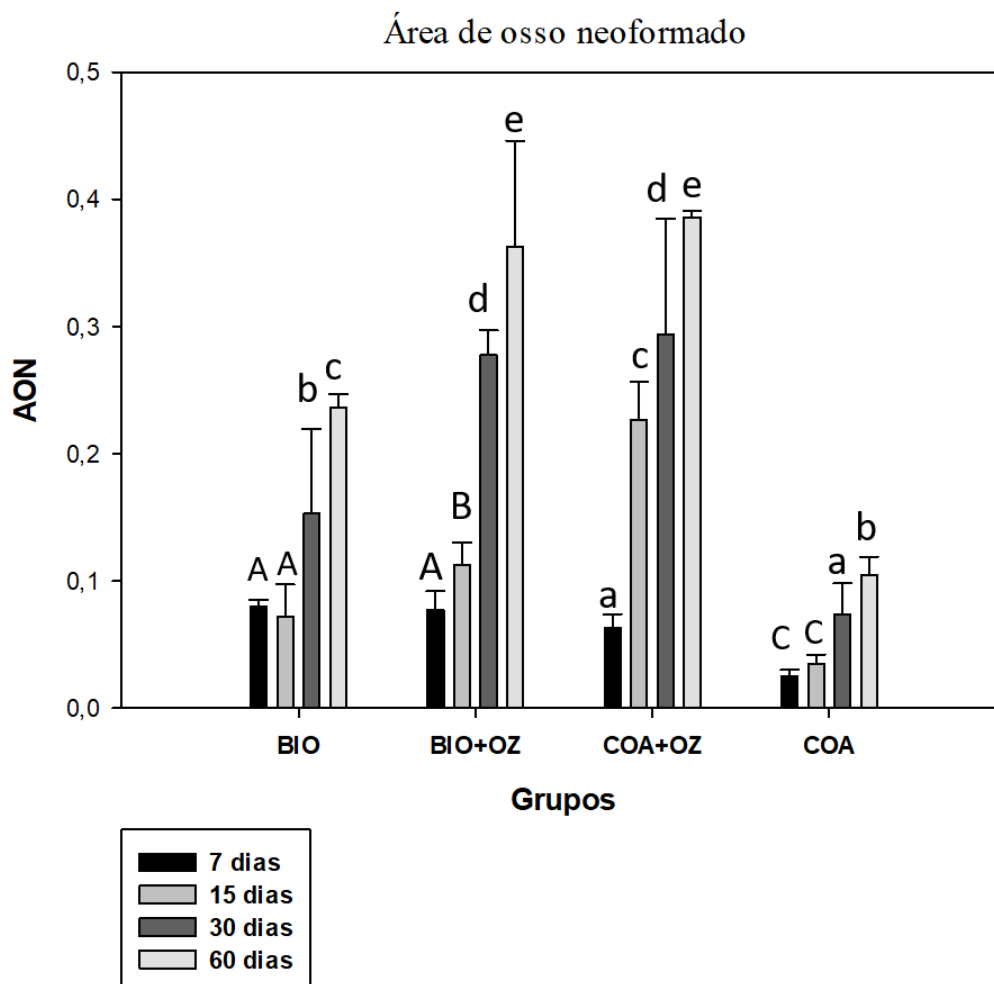
4.2.2 Área de osso neoformado (AON)

Em relação a área de osso neoformado intragrupos, levando em consideração o fator tempo e todos os grupos avaliados, todos apresentaram aumento da área de osso neoformado de forma cronológica, e só não houveram diferenças estatísticas entre os períodos de 7 para 15 dias; com exceção do grupo COA+OZ em que houve um grande salto de crescimento na comparação destes períodos, com diferença estatística ($p=0,014$).

Na avaliação intergrupos, aos 7 dias, o grupo BIO+OZ foi o que obteve as maiores médias ($p<0,05$), enquanto o grupo COA obteve as menores ($p<0,05$), com diferença estatística.

No período de 15 dias, o grupo COA+OZ destacou-se com um grande salto de crescimento, com médias superiores aos outros grupos, com diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$). Aos 30 e 60 dias, os grupos BIO+OZ ($p<0,05$) e COA+OZ ($p<0,05$) obtiveram as maiores áreas de tecido ósseo neoformado com diferenças estatísticas significativas em relação aos grupos BIO ($p<0,01$) e COA ($p<0,01$), mas sem diferenças estatísticas significativas quando comparados entre si ($p<0,01$).

Figura 25. Gráfico comparativo das médias e desvio padrão da área de osso neoformado de todos os grupos (BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA) para os tempos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias. As letras maiúsculas demonstram as diferenças estatísticas significantes intergrupos e as letras minúsculas demonstram as diferenças estatísticas intragrupos.



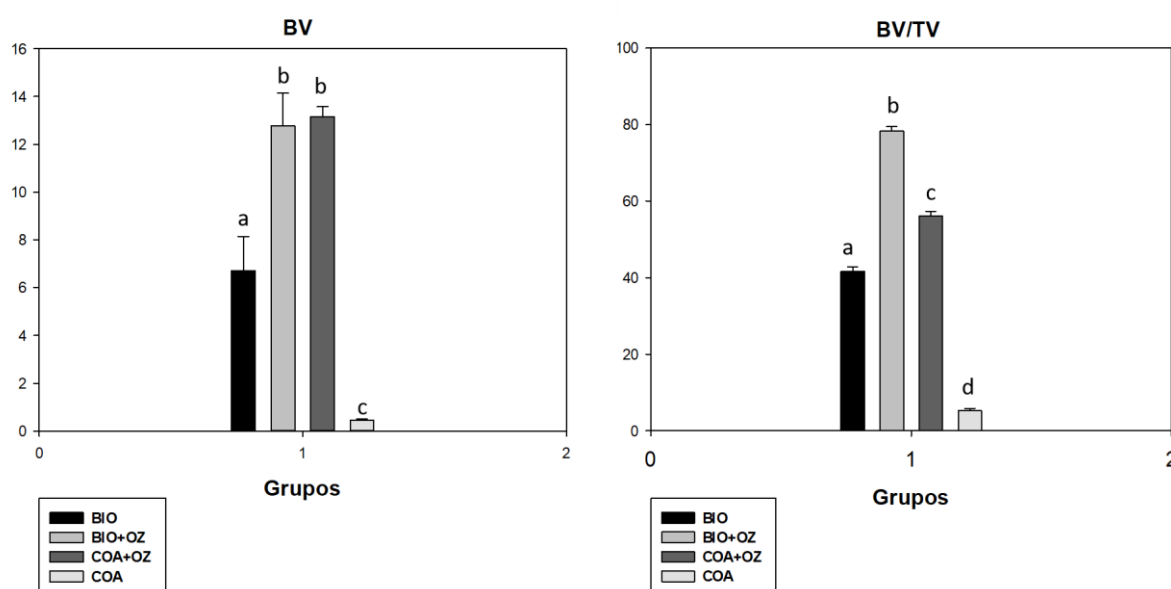
4.3 Análise de Micro TC

Em relação à quantidade óssea encontrada nas análises microtomográficas, no parâmetro que mede o volume ósseo (BV), os grupos BIO+OZ (12,77406 mm³) e COA+OZ (13,155 mm³) obtiveram as maiores médias ($p < 0,05$), com diferenças estatísticas significativas quando comparados com os grupos BIO (6,71617 mm³) e grupo COA (0,43961 mm³), mas sem diferenças estatísticas quando comparados entre si ($p = 0,777$).

Já no parâmetro que mede o volume ósseo em relação ao volume do tecido (BV/TV), foi possível observar diferenças estatísticas entre todos os grupos ($p < 0,05$),

sendo que o grupo BIO+OZ (78,24895%) apresentou os maiores resultados, seguido do grupo COA+OZ (56,13554%). Os grupos BIO (41,6670%) e COA obtiveram os menores resultados, sendo que o grupo COA (5,26081%) atingiu resultado significativamente inferior aos outros grupos ($p < 0,05$).

Figura 26. Gráficos demonstrando a média e o desvio padrão dos parâmetros BV e BV/TV, no período de 60 dias para os grupos BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA. As diferenças estatísticas significantes entre os grupos estão representadas pelas letras minúsculas diferentes (a, b, c e d).



Na avaliação microtomográfica referente à qualidade do tecido ósseo, os dados obtidos no parâmetro que mede a espessura das trabéculas (Tb.Th), mostraram diferenças estatísticas apenas entre os grupos COA (0,23359 mm) x BIO+OZ (0,17706 mm) ($p < 0,05$), e entre os grupos COA (0,23359 mm) x BIO (0,17941mm) ($p < 0,05$), sendo que o grupo controle negativo (COA), atingiu maior separação das trabéculas dentre todos os grupos analisados ($p < 0,05$).

Em relação ao parâmetro que quantifica o número de trabéculas, o grupo COA (0,261965 mm) obteve a menor média em relação aos outros grupos ($p < 0,05$), com diferenças estatísticas em relação aos grupos que receberam a ozonioterapia (BIO+OZ (3,77777mm) e COA+OZ (3,82335mm)), que atingiram as maiores médias dentre todos os grupos sem diferenças estatísticas significativas quando comparados

entre si. Os dados obtidos no parâmetro que mede a separação das trabéculas (Tb.Sp), o grupo COA (0,26753mm) atingiu as maiores médias com diferenças estatísticas associadas ($p < 0,05$), quando comparado aos outros grupos. Os grupos BIO (0,18385mm), BIO+OZ (0,14986mm) e COA+OZ (0,18435mm) apresentaram resultados similares, sem diferenças estatísticas significantes.

Na avaliação do parâmetro que mede a porosidade do tecido ósseo (Po(tot)), foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas comparações entre todos os grupos ($p < 0,05$). O grupo COA (95,58246%) apresentou o tecido ósseo com maior porosidade, seguido do grupo BIO (55,02148%). Ambos os grupos que receberam o tratamento com ozônio obtiveram o tecido ósseo menos poroso, sendo que o grupo que recebeu a membrana de colágeno porcino (BIO+OZ) apresentou a menor porosidade (33,45287%) quando comparado ao grupo que não recebeu a membrana (COA+OZ) (47,93512%) ($p < 0,05$).

Figura 27. Gráficos demonstrando a média e o desvio padrão dos parâmetros Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N e Po(tot), no período de 60 dias para os grupos BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA. As diferenças estatísticas significantes entre os grupos estão representadas pelas letras minúsculas diferentes (a, b, c e d).

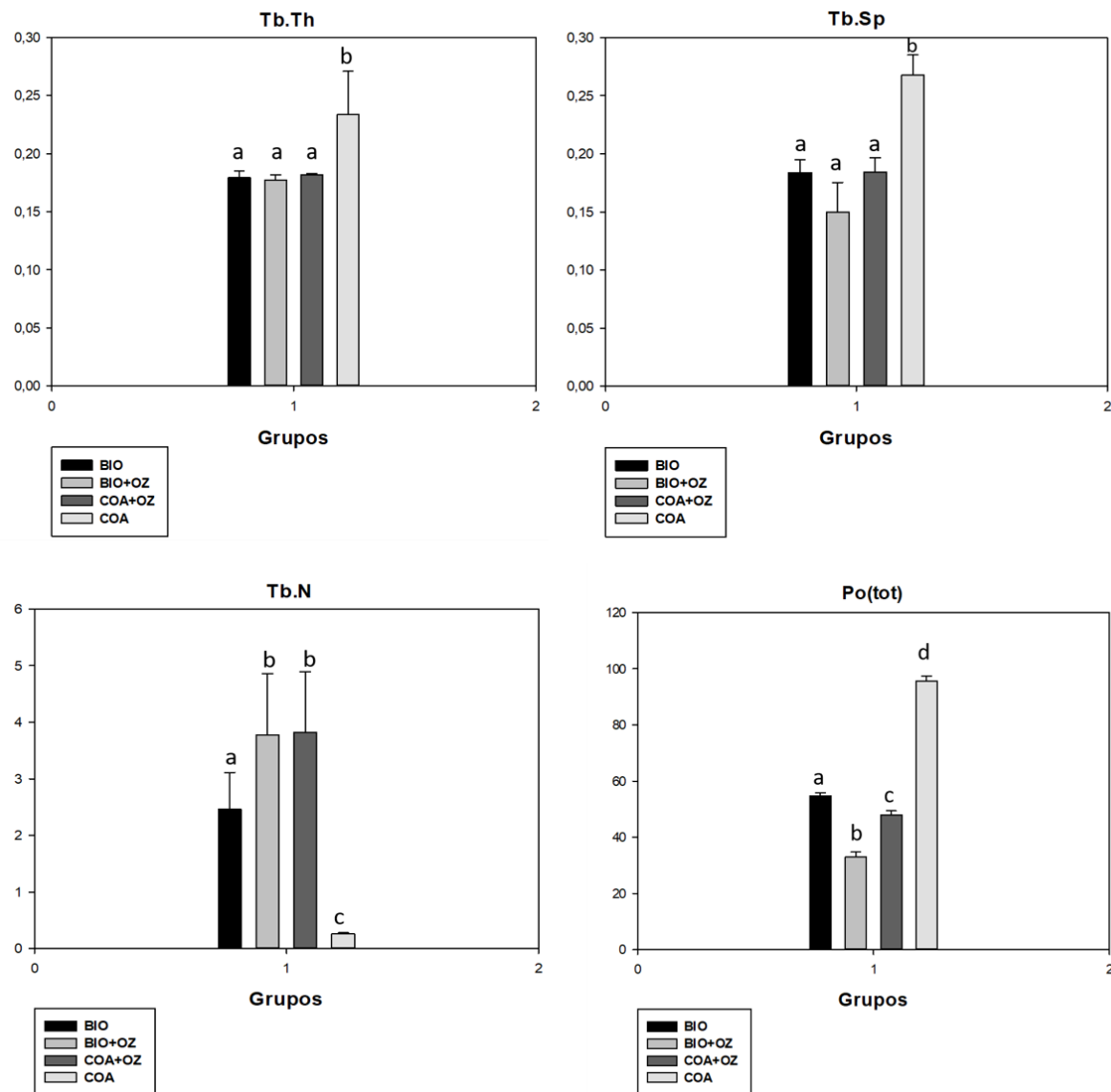
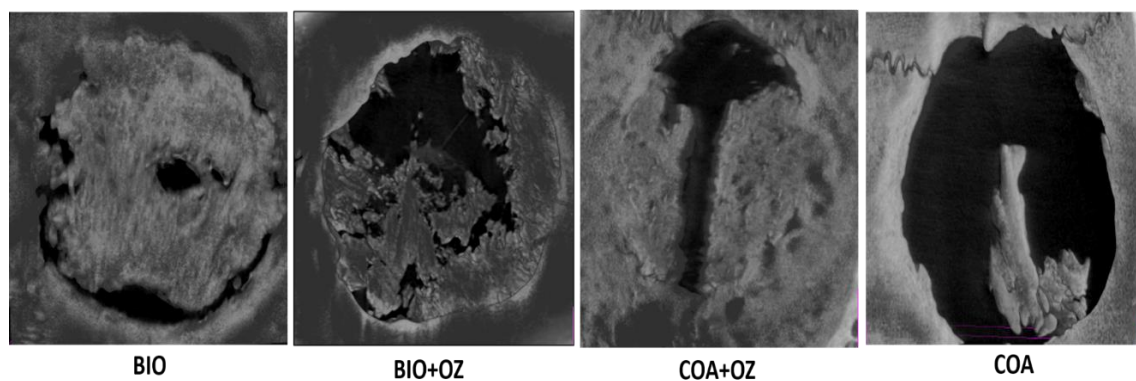


Figura 28. Reconstrução axial do defeito crítico na calota dos animais dos grupos BIO, BIO+OZ, COA+OZ e COA eutanasiados aos 60 dias pós-operatórios.



5 DISCUSSÃO

Apesar do alto índice de sucesso e da crescente utilização das membranas biodegradáveis na ROG, a busca por terapias adjuvantes que possam auxiliar nos processos regenerativos tem despertado interesse na comunidade científica. A utilização desses biomateriais a base de polímeros naturais ou sintéticos é capaz de garantir a osteopromoção e aumentar a previsibilidade do ganho de tecido ósseo através da permeabilidade seletiva e da manutenção do espaço necessário para a estabilização do coágulo sanguíneo, e seu uso já é amplamente validado pela literatura [28-30].

Embora existam inúmeras vantagens atreladas ao uso das membranas reabsorvíveis, algumas limitações devem ser levadas em consideração, como a funcionalidade de barreira ter duração mais curta e o menor tempo de degradação, principalmente quando utilizadas em defeitos ósseos de grande volume. A crescente utilização desses biomateriais associada à busca pelo material com melhor aplicabilidade clínica e melhor custo-benefício, fez com que a engenharia tecidual desenvolvesse membranas de origem, estrutura e propriedades físicas distintas [31,32].

Atualmente existem variados tipos de membranas reabsorvíveis disponíveis comercialmente, que diferem em relação ao comportamento biológico [6]. Sendo assim, é fundamental avaliar de que maneira essas barreiras atuam na função regenerativa do organismo, seu tempo de permanência a fim de manter a integridade estrutural pelo tempo necessário para a proliferação e maturação das células desejáveis (osteoblastos e osteoclastos), além de fatores como a biocompatibilidade e a ausência de materiais residuais que possam influenciar de forma negativa na regeneração dos tecidos.

A membrana BioGide® utilizada neste trabalho como controle positivo, é composta por uma dupla camada de colágeno porcino tipo I e tipo III, sendo uma camada externa compacta que fica em contato com os tecidos moles e uma camada interna porosa, que está em contato com o tecido ósseo. A dupla camada justifica grande parte do seu sucesso clínico tão bem elucidado na literatura [4,5], pois apesar

do colágeno ser considerado um material com alta taxa de degradação, a dupla camada garante que a membrana seja suficientemente rígida para suportar forças compressivas dos tecidos adjacentes, além de tornar seu período de degradação lento. Além disso, apesar da alta taxa de degradação, o colágeno é o principal componente do tecido conjuntivo, possui baixa imunogenicidade, capacidade de atrair fibroblastos e tem papel importante na comunicação células-matriz [6].

Uma das características ideais de uma membrana é a capacidade de promover a angiogênese a fim de garantir o suprimento sanguíneo, para que seja possível a proliferação e migração das células epiteliais para o local de regeneração onde o tecido ósseo deve ser produzido. Trabalhos vêm demonstrando [19,21-23,33] que a utilização da terapia com ozônio também é capaz de favorecer a proliferação e a diferenciação celular, e que o ozônio é capaz de oferecer benefícios adicionais nos processos de reparação tecidual, assim como as membranas reabsorvíveis de colágeno.

Na avaliação intragrupos do perfil inflamatório, em relação à capacidade angiogênica durante o processo de reparo, os grupos BIO, BIO+OZ e COA apresentaram um aumento na angiogênese no período de 7 para 15 dias, característica relevante para o sucesso da ROG, enquanto o grupo COA+OZ não obteve diferenças estatísticas significantes entre os dois períodos analisados, entretanto apresentou uma quantidade de vasos significativa já nos 7 dias de reparo.

Na comparação intergrupos da quantidade de vasos sanguíneos, nos dois períodos, 7 e 15 dias, o grupo que teve o defeito ósseo crítico preenchido apenas pelo coágulo sanguíneo, mas que recebeu a terapia sistêmica com ozônio (COA+OZ), apresentou as maiores médias com diferenças estatísticas significativas quando comparado com o grupo que não recebeu a ozonioterapia (COA), e também quando comparado com o grupo que teve o defeito preenchido pela membrana de colágeno, sem tratamento com ozônio (BIO), e com tratamento com ozônio (BIO+OZ). Enquanto isso, o grupo COA apresentou a menor quantidade de vasos sanguíneos em comparação aos outros três grupos, o que já era esperado visto que esses animais não receberam nenhum tipo de tratamento.

Em relação à resposta inflamatória, na avaliação intragrupos, foi possível observar que o grupo COA+OZ foi o grupo que apresentou a redução mais significativa na quantidade de células no período de 7 para 15 dias, associada a diferença estatística. Avaliando a comparação intergrupos, no período de 15 dias, o grupo COA+OZ também foi o grupo que apresentou a menor reação inflamatória, com diferenças estatísticas em relação aos outros três grupos. Neste mesmo período, o grupo COA apresentou a maior reação inflamatória com diferença estatística em relação aos grupos BIO+OZ e COA+OZ, entretanto quando comparado ao grupo que não recebeu a ozonioterapia (BIO), não foi observada diferença estatística significativa. Sendo assim, podemos associar a utilização da terapia com ozônio com a diminuição da resposta inflamatória, o que é de suma importância quando falamos em processos regenerativos.

Além disso, quando associamos os resultados encontrados na avaliação do perfil inflamatório de forma geral, é possível notar que a menor reação inflamatória obtida pelo grupo COA+OZ está em conformidade com a maior capacidade angiogênica obtida pelo mesmo grupo, da mesma forma que o grupo COA apresentou a maior reação inflamatória e a menor formação de vasos sanguíneos.

Estudos recentes [19,24,34] vêm demonstrando que o ozônio tem o poder de aumentar a oferta de oxigênio tecidual já que é capaz de se difundir para os tecidos e causar vasodilatação das arteríolas estimulando o fluxo sanguíneo e aumentando a disponibilidade de oxigênio, nutrientes e componentes imunológicos. Sua influência na diminuição do tempo da reparação tecidual está relacionada com a característica oxidativa do seu mecanismo de ação, já que o ozônio interage com os ácidos graxos insaturados presentes nas membranas das células, originando peróxidos como o H_2O_2 , que estimula o sistema imunológico através da liberação de substâncias antioxidantes no organismo, além disso, o ozônio é capaz liberar fatores de crescimento para construção da matriz extracelular que auxiliam no processo de reparo tecidual [18,35-37].

Somado a essas características, o ozônio também auxilia na redução da inflamação e na cicatrização de feridas, pois também é capaz de sintetizar mediadores químicos da inflamação, como as prostaglandinas, interleucinas e leucotrienos, fato que justifica os dados encontrados na análise do perfil inflamatório deste trabalho.

Diferenças interessantes foram encontradas em relação ao curso do processo de reparo entre os grupos que receberam a terapia com ozônio sistêmico e aqueles que não receberam. É possível correlacionar os resultados obtidos na quantificação das células inflamatórias e do aporte vascular com a quantidade de tecido ósseo neoformado nos processos de ROG [38].

Na comparação intergrupos em relação à área de osso neoformado, o grupo COA (controle negativo) alcançou as menores médias em todos os períodos analisados (7, 15, 30 e 60 dias), o que já era previsto pois os animais pertencentes a esse grupo não receberam nenhum tipo de tratamento ou biomaterial, ocasionando em um processo inflamatório maior e uma capacidade angiogênica menor, resultando consequentemente em menor área de tecido ósseo neoformado, com diferenças estatísticas em relação aos demais grupos.

Os dados obtidos através da quantificação da área de osso neoformado (Figura 25), nos mostra que os animais que receberam a ozonioterapia, dos grupos BIO+OZ e COA+OZ, resultaram em uma neoformação óssea maior, com diferenças mais relevantes comparados aos grupos controle positivo (BIO) e controle negativo (COA) principalmente nos tempos experimentais de 30 e 60 dias. Foi possível notar que o grupo teste que não teve o defeito ósseo crítico preenchido pela membrana de colágeno porcino, mas que recebeu a terapia com o ozônio (COA+OZ), atingiu resultados tão satisfatórios quanto o grupo que recebeu a membrana BioGide® e a ozonioterapia (BIO+OZ), e resultados superiores quando comparado aos animais que receberam apenas a membrana de colágeno (BIO) considerada padrão ouro atualmente, sugerindo mais uma vez que o ozônio tem influência positiva no processo de reparo.

Vale ressaltar que, do período de 7 para 15 dias pós-operatórios, o grupo COA+OZ apresentou um grande salto de crescimento resultando em uma área de tecido ósseo neoformado muito próxima daquela obtida pelo grupo BIO no tempo experimental final de 60 dias.

Os achados microtomográficos realizados no período de 60 dias, corroboram com os dados histométricos, tanto em relação a quantidade de tecido ósseo encontrada, como em relação a qualidade desse tecido. Em relação a quantidade,

analisando os parâmetros BV e BV/TV que medem o volume ósseo e o volume ósseo em relação ao tecido respectivamente, nota-se que os grupos que receberam a terapia com ozônio (COA+OZ e BIO+OZ) atingiram os maiores valores, ambos com boa evolução cicatricial, em conformidade com a histometria. Ao observar a qualidade do tecido ósseo formado, observa-se que os grupos COA+OZ e BIO+OZ apresentaram maior número de trabéculas ósseas, e um tecido ósseo menos poroso quando comparado aos grupos que não receberam o ozônio como tratamento (grupo BIO e grupo COA).

Analisando o grupo controle positivo que recebeu a membrana BioGide® (BIO), nota-se que em todas as análises (morfológica, histométrica e de MicroCT), o grupo apresentou resultados superiores em relação ao grupo controle negativo (COA), porém apesar do alto índice de sucesso desta membrana reabsorvível, quando comparado aos grupos que receberam a ozonioterapia sistêmica (BIO+OZ e COA+OZ), os animais do grupo BIO apresentaram maior inflamação e menor aporte vascular aos 7 e 15 dias, além de um tecido ósseo em quantidade e qualidade inferiores nos tempos experimentais finais de 30 e 60 dias.

A membrana BioGide® tem alta permeabilidade, o que permite capacidade angiogênica superior a outras membranas encontradas comercialmente, além de provocar menor reação inflamatória, que pode estar associada com a biocompatibilidade da membrana e a sua degradação, melhorando a capacidade cicatricial na ROG [5,38]. Portanto, os dados obtidos nos grupos experimentais (COA+OZ e BIO+OZ), trazem informações interessantes na busca de terapias e biomateriais que possam aumentar a capacidade osteocondutora, melhorando ainda mais os processos de reparo dentro da implantodontia, pois sugerem que o ozônio possa ter induzido de maneira positiva a proliferação celular e a resposta cicatricial.

A terapia com ozônio é reconhecida no Brasil como procedimento odontológico pelo Conselho Federal de Odontologia (Resolução CFO no.166/2015) desde 2015, embora o Conselho Federal de Medicina ainda relute em regulamentar o uso do ozônio considerando a técnica em fase experimental. O ozônio vem sendo utilizado na odontologia em várias áreas, como no controle da cárie dentária, endodontia, tratamento da gengivite e periodontite, osteonecrose dos maxilares, entre outras. Além disso, boa parte da Europa, Ásia e América Latina já tem a ozonioterapia como

procedimento médico legítimo e seu uso é amplamente permitido em humanos, trazendo resultados notórios quanto a eficácia, versatilidade e segurança da técnica, com mínimos efeitos colaterais [17,19,37].

Por essa razão, trata-se de uma vertente com potencial de crescimento como terapia coadjuvante aos tratamentos convencionais, principalmente por diminuir a sintomatologia dolorosa e otimizar o processo cicatricial.

6 CONCLUSÃO

A ozonioterapia sistêmica é capaz de influenciar de maneira positiva a regeneração óssea guiada associada ou não a membrana reabsorvível de colágeno. Estudos devem se concentrar na busca de um protocolo de administração seguro do ozônio para uso terapêutico.

REFERÊNCIAS

1. Sinhoret, M.A.C.; Vitti, R.P.; Correr-Sobrinho, L. Biomateriais na odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.* **2013**, *67*, 256–261.
2. Guastaldi, A.C.; Aparecida, A.H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1352–1358; DOI:10.1590/S0100-40422010000600025.
3. Hassumi, J.S.; Mulinari-Santos, G.; Fabris, A.L.S.; Jacob, R.G.M.; Gonçalves, A.; Rossi, A.C.; Freire, A.R.; Faverani, L.P.; Okamoto, R. Alveolar bone healing in rats: micro-ct, immunohistochemical and molecular analysis. *J. Appl. Oral Sci.* **2018**, *26*, e20170326; DOI:10.1590/1678-7757-2017-0326.
4. Bunyaratavej, P.; Wang, H.L. Collagen membranes: a review. *J. Periodontol.* **2001**, *72*, 215–229; DOI:10.1902/jop.2001.72.2.215.
5. Danieletto-Zanna, C.F.; Bizelli, V.F.; Ramires, G.A.D.A.; Francatti, T.M.; Carvalho, P.S.P.; Bassi, A.P.F. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: histological and immunohistochemical analysis. *Int. J. Biomater* **2020**, *2020*, 6426702; DOI:10.1155/2020/6426702.
6. Elgali, I.; Omar, O.; Dahlin, C.; Thomsen, P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur. J. Oral Sci.* **2017**, *125*, 315–337; DOI:10.1111/EOS.12364.
7. Piattelli, A.; Scarano, A.; Coraggio, F.; Matarasso, S. Early tissue reactions to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit. *Biomaterials* **1998**, *19*, 889–896; DOI:10.1016/S0142-9612(97)00173-7.
8. von Arx, T.; Buser, D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin. Oral Implants Res.* **2006**, *17*, 359–366; DOI:10.1111/j.1600-0501.2005.01234.x.

9. Lee, S.W.; Kim, S.G. Membranes for the guided bone regeneration. *Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.* **2014**, *36*, 239-246; DOI:10.14402/JKAMPRS.2014.36.6.239.
10. Sbricoli, L.; Guazzo, R.; Annunziata, M.; Gobbato, L.; Bressan, E.; Natri, L. Selection of collagen membranes for bone regeneration: a literature review. *Materials* **2020**, *13*, 786; DOI:10.3390/MA13030786.
11. Yamamoto, K.; Yoshizawa, Y.; Yanagiguchi, K.; Ikeda, T.; Yamada, S.; Hayashi, Y. The characterization of fish (*Tilapia*) collagen sponge as a biomaterial. *Int. J. Polym. Sci.* **2015**, *2015*, 957385; DOI:10.1155/2015/957385.
12. Wang, J.; Qu, Y.; Chen, C.; Sun, J.; Pan, H.; Shao, C.; Tang, R.; Gu, X. Fabrication of collagen membranes with different intrafibrillar mineralization degree as a potential use for GBR. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2019**, *104*, 109959; DOI:10.1016/J.MSEC.2019.109959.
13. Sheikh, Z.; Qureshi, J.; Alshahrani, A.M.; Nassar, H.; Ikeda, Y.; Glogauer, M.; Ganss, B. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontology* **2017**, *105*, 1–12; DOI:10.1007/S10266-016-0267-0.
14. Baysan, A.; Lynch, E. The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. Ozone and root caries. *Prim. Dent. Care* **2006**, *13*, 37–41; DOI:10.1308/135576106775193897.
15. Erdemci, F.; Gunaydin, Y.; Sencimen, M.; Bassorgun, I.; Ozler, M.; Oter, S.; Gulses, A.; Gunal, A.; Sezgin, S.; Bayar, G.R.; Dogan, N.; Gider, I. K. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2014**, *43*, 777–783; DOI:10.1016/J.IJOM.2013.12.007.
16. Buyuk, S.K.; Ramoglu, S.I.; Sonmez, M.F. The effect of different concentrations of topical ozone administration on bone formation in orthopedically expanded suture in rats. *Eur. J. Orthod.* **2016**, *38*, 281–285; DOI:10.1093/EJO/CJV045.

17. Kazancioglu, H.O.; Ezirganli, S.; Aydin, M.S. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. *J. Craniofac. Surg.* **2013**, *24*, 2141–2146; DOI:10.1097/SCS.0B013E3182A244AE.
18. Ozdemir, H.; Toker, H.; Balci, H.; Ozer, H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J. Periodontal Res.* **2013**, *48*, 722–726; DOI:10.1111/JRE.12060.
19. Azarpazhooh, A.; Limeback, H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J. Dent.* **2008**, *36*, 104–116; DOI:10.1016/j.jdent.2007.11.008.
20. Elvis, A.M.; Ekta, J.S. Ozone therapy: a clinical review. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* **2011**, *2*, 66–70; DOI:10.4103/0976-9668.82319.
21. Suh, Y.; Patel, S.; Kaitlyn, R.; Gandhi, J.; Joshi, G.; Smith, N.; Khan, S. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med. Gas. Res.* **2019**, *9*, 163–167; DOI:10.4103/2045-9912.266997.
22. Anzolin, A.P.; Bertol, C.D. Ozonioterapia como terapêutica integrativa no tratamento da osteoartrose: uma revisão sistemática. *BrJP* **2018**, *1*, 171–175; DOI:10.5935/2595-0118.20180033.
23. Sen, S.; Sen, S. Ozone therapy a new vista in dentistry: integrated review. *Med. Gas. Res.* **2020**, *10*, 189–192; DOI:10.4103/2045-9912.304226.
24. Zellin, G.; Linde, A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials* **1996**, *17*, 695–702; DOI:10.1016/0142-9612(96)86739-1.
25. Ramalho-Ferreira, G.; Faverani, L.P.; Prado, F.B.; Garcia, I.R.; Okamoto, R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2015**, *44*, 798–805; DOI:10.1016/J.IJOM.2015.02.018.
26. Faverani, L.P.; Polo, T.O.B.; Ramalho-Ferreira, G.; Momesso, G.A.C.; Hassumi, J.S.; Rossi, A.C.; Freire, A.R.; Prado, F.B.; Luvizuto, E.R.; Gruber, R.; Okamoto, R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired

- osseointegration in osteoporotic rats. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *22*, 255–265; DOI:10.1007/S00784-017-2106-2.
27. Bassi, A.P.F.; Bizelli, V.F.; Mendes Brasil, L.F.; Pereira, J.C.; Al-Sharani, H.M.; Momesso, G.A.C.; Faverani, L.P.; Lucas, F.A. Is the bacterial cellulose membrane feasible for osteopromotive property? *Membranes* **2020**, *10*, 230; DOI:10.3390/MEMBRANES10090230.
 28. Fujioka-Kobayashi, M.; Katagiri, H.; Lang, N.P.; Imber, J.C.; Schaller, B.; Saulacic, N. Addition of synthetic biomaterials to deproteinized bovine bone mineral (DBBM) for bone augmentation: a preclinical in vivo study. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10516; DOI:10.3390/ijms231810516.
 29. Imbronito, A.V.; Todescan, J.H.; Carvalho, C.V.; Arana-Chavez, V.E. Healing of alveolar bone in resorbable and non-resorbable membrane-protected defects. a histologic pilot study in dogs. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4079–4086; DOI:10.1016/S0142-9612(02)00145-X.
 30. Zwahlen, R.A.; Cheung, L.K.; Zheng, L.W.; Chow, R.L.K.; Li, T.; Schuknecht, B.; Grätz, K.W.; Weber, F.E. Comparison of two resorbable membrane systems in bone regeneration after removal of wisdom teeth: a randomized-controlled clinical pilot study. *Clin. Oral Implants Res.* **2009**, *20*, 1084–1091; DOI:10.1111/j.1600-0501.2009.01751.x.
 31. Ra, G.; Wo, Q. Bone regeneration in dentistry: an overview. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2021**, *35*, 37–45.
 32. Reis, E.C.C.; Borges, A.P.B.; Oliveira, P.M.; Bicalho, S.M.C.M.; Reis, A.M.; Silva, C.L. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. *Polímeros* **2012**, *22*, 73–79; DOI:10.1590/S0104-14282012005000007.
 33. Srikanth, A.; Sathish, M.; Harsha, A.V.S. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **2013**, *5*, S89–S94; DOI:10.4103/0975-7406.113304.

34. Ripamonti, C.I.; Maniezzo, M.; Boldini, S.; Pessi, M.A.; Mariani, L.; Cislighi, E. Efficacy and tolerability of medical ozone gas insufflations in patients with osteonecrosis of the jaw treated with bisphosphonates-preliminary data: medical ozone gas insufflation in treating ONJ lesions. *J. Bone Oncol.* **2012**, *1*, 81–87; DOI:10.1016/J.JBO.2012.08.001.
35. Kim, H.S.; Noh, S.U.; Han, Y.W.; Kim, K.M.; Kang, H.; Kim, H.O.; Park, Y.M. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J. Korean Med. Sci.* **2009**, *24*, 368–374; DOI:10.3346/JKMS.2009.24.3.368.
36. Lim, Y.; Lee, H.; Woodby, B.; Valacchi, G. Ozonated oils and cutaneous wound healing. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25*, 2264–2278; DOI:10.2174/1381612825666190702100504.
37. Ripamonti, C.I.; Maniezzo, M.; Pessi, M.A.; Boldini, S. Treatment of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) by medical ozone gas insufflation. A case report. *Tumori* **2012**, *98*, 72e-75e; DOI:10.1700/1125.12414.
38. Patino, M.G.; Neiders, M.E.; Andreana, S.; Noble, B.; Cohen, R.E. Cellular inflammatory response to porcine collagen membranes. *J. Periodontal Res.* **2003**, *38*, 458–464; DOI:10.1034/J.1600-0765.2003.00017.X.

ANEXOS

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação das propriedades reparacionais de membranas biodegradáveis associada ao uso da ozonioterapia como terapia auxiliar**", Processo FOA nº 0292-2021, sob responsabilidade de Ana Paula Farnezi Bassi apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 10 de Abril de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Maio de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the reparational properties of biodegradable membranes associated with the use of ozonotherapy as auxiliary therapy**", Protocol FOA nº 0292-2021, under the supervision of Ana Paula Farnezi Bassi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 10, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 10, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO B - ARRIVE GUIDELINES (MEMBRANES)

<https://www.mdpi.com/journal/membranes/instructions>