



PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA

MELISSA FACCINI

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS EFEITOS DA APLICAÇÃO LOCAL DE OZÔNIO
NA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA EM RATOS**

MARINGÁ
2020



PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA

MELISSA FACCINI

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA APLICAÇÃO LOCAL DE OZÔNIO NA
MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA EM RATOS**

Dissertação em formato artigo apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Maria Salvatore de Freitas

MARINGÁ

2020

MELISSA FACCINI

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA APLICAÇÃO LOCAL DE OZÔNIO NA
MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA EM RATOS**

Dissertação em formato artigo apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia.

Maringá, 25 de maio de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karina Maria Salvatore de Freitas
UNINGÁ

Profa. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Samira Salmeron
UNINGÁ

“A pessoa que chega mais longe é geralmente aquela que está disposta a fazer e ousar. O barco seguro nunca vai muito longe da margem”.

Dale Carnegie

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.

Aos meus pais, Vera e Luiz, que sempre me incentivaram para crescimento profissional e me deram todos os tipos de suporte, mesmo em tempos difíceis.

Ao meu irmão, Giuliano, que me serviu como exemplo de ser estudioso, uma inspiração para mim.

Às minhas avós Eli Maria Dalcin Montagner e Teresinha de Oliveira Faccini.

Ao meu marido Rafael Romani, que sempre me apoiou em tudo e sempre confiou no meu potencial até mesmo quando eu não confiava. Seu apoio é fundamental como meu companheiro de jornada.

Ao meu filho Caetano, que desde pequenino mostrou ser forte e compreensivo.

O amor destas pessoas por mim, e o meu amor por eles, é o motivo para eu lutar por qualquer coisa, por mais difícil que seja.

Me sinto orgulhosa em poder apresentar a minha conquista profissional, na forma deste trabalho, aos meus amores. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço `a Deus pelas oportunidades por Ele oferecidas a mim, por me guiar e me orientar para o melhor caminho.

Agradeço a cada um que ajudou para que, de alguma forma, que este trabalho se concretizasse.

Ao meu colega Felipe Agostini, que junto comigo, idealizou este trabalho.

Aos professores Carlos Nogales, Francisco Campos e Glauber Carinhena que me deram as primeiras orientações e direções.

Ao colega Tassio Drieu que ajudou a operar os ratinhos.

À professora Dra. Samira Salmeron que também apoiou o projeto.

À equipe da São Leopoldo Mandic: Aguinaldo Garcez, Mabiliane Albuquerque e Mariana Franco de Oliveira.

À professora Dra. Ana Regina Casarotto, que analisou e avaliou as lâminas.

Também não poderia deixar de agradecer aos amigos que fiz: Francisco Fitarelli, que juntamente com o Felipe Agostini, me apoiaram e me deram dicas valiosas do mestrado durante as viagens à Maringá. Duas amízaes que quero levar para sempre comigo.

Agradeço pela convivência com os colegas de turma e aos colegas das turmas 10 e 12. Deus não coloca as pessoas na nossa vida por acaso. Lembrarei do que aprendi com cada um de vocês.

Agradeço também aos professores Dr. Rodrigo Cançado e Dr. Fabrício Valarelli. Grandes mestres, que me inspiram.

Agradeço especialmente à professora Dra. Karina Freitas, que aceitou ser minha orientadora e foi incansável nas correções deste trabalho. Uma pessoa realmente espetacular que ganhou meu respeito e admiração por ser quem é: uma pessoa simples, inteligentíssima, de coração bom, que ajuda a todos.

RESUMO

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar histologicamente o efeito da aplicação local de ozônio na movimentação dentária induzida em um modelo animal. **Material e Métodos:** A amostra foi composta por 24 ratos *Wistar* divididos em três grupos (n=8), neles foi instalada uma mola de NITI, do primeiro molar superior ao incisivo central superior do lado direito, com força de 50g. O grupo 1 (controle) não recebeu aplicação de ozonioterapia e os grupos 2 e 3 receberam 1ml de gás ozonizado nas concentrações de 10 µg/ml e 60 µg/ml, respectivamente, na região de fundo de sulco do primeiro molar superior. Os animais foram eutanasiados 3 e 5 dias após o procedimento. Lâminas de cortes histológicos foram obtidas, longitudinais ao longo eixo do primeiro molar, no sentido mesiodistal e nelas foram avaliadas o número de osteoclastos, osteoblastos, vasos sanguíneos, áreas hialinas, células polimorfonucleares e mononucleares, formação de tecido osteoide e pontos de reabsorção radicular através de microscópio óptico, em áreas determinadas de tensão e pressão. A comparação dos parâmetros avaliados entre as duas concentrações de ozônio e o controle em cada tempo (3 e 5 dias) foram realizadas pelos testes de Kruskal-Wallis, teste de Dunn, e qui-quadrado. **Resultados:** No lado de pressão aos 3 dias observou-se um número significamente maior de osteoclastos nos 2 grupos tratados com ozônio (p=0,033) e também maior número de vasos sanguíneos (p=0,017) e células polimorfonucleares (p=0,009) no grupo 2. No lado de tensão, houve um número significamente maior de vasos sanguíneos (p=0,036), osteoblastos (p=0,023) e células mononucleares (p=0,006) no grupo 2. Aos 5 dias no lado de pressão, número significamente maior de osteoclastos (p=0,029) no grupo 2, vasos sanguíneos (p=0,007) e osteoblastos (p=0,028) nos 2 grupos tratados com ozônio e menor número de células polimorfonucleares (p=0,049) no grupo 3. No lado de tensão, a quantidade de vasos sanguíneos no grupo 3 foi estatisticamente menor do que nos outros grupos (p=0,019). Já o grupo 1 apresentava maior quantidade de células polimorfonucleares e mononucleares do que nos demais grupos. Houve formação de tecido osteoide e significamente menos áreas hialinas nos dois grupos de ozônio comparados ao grupo controle. Houve maior reabsorção radicular aos 5 dias para os grupos tratados com ozônio em ambas as concentrações em relação ao controle. **Conclusão:** A terapia com ozônio aumentou o número de osteoclastos no lado de pressão e osteoblastos no lado de tensão, na concentração de 10 µg/ml, durante o período avaliado, demonstrando parâmetros histológicos favoráveis à osteorremodelação. Na concentração de 60 µg/ml, acelerou o processo de reorganização do ligamento periodontal.

Palavras-Chave: Movimentação Ortodôntica. Ozônio. Ortodontia.

ABSTRACT

ABSTRACT

INFLUENCE OF LOCAL OZONE APPLICATION ON THE INFLAMMATORY RESPONSE TO INDUCED DENTAL MOVEMENT IN RATS

Objective: The objective of this study was to evaluate the action of ozone on induced dental movement in an animal model. **Material and Methods:** The sample consisted of 24 Wistar rats divided into three groups (n=8) and in all rats a NITI spring was installed, from the maxillary first molar to the maxillary central incisor on the right side, with a force of 50g. Group 1 (control) did not receive any ozone therapy and groups 2 and 3 received 1 ml of ozonated gas at concentrations of 10 µg/ml and 60 µg/ml, respectively, in the buccal mucosa above the maxillary first molar. The animals were euthanized 3 and 5 days after the procedure. Histological sections were obtained, longitudinal along the long axis of the first molar, in the mesiodistal direction and in them, the number of osteoclasts, osteoblasts, blood vessels, hyaline areas, polymorphonuclear and mononuclear cells, formation of osteoid tissue and points of root resorption were evaluated through light microscope, in determined areas of tension and pressure. The comparison of the parameters evaluated between the two ozone concentrations and the control at each time (3 and 5 days) were performed using the Kruskal-Wallis, Dunn, and chi-square tests. **Results:** On the pressure side at 3 days, a significantly higher number of osteoclasts was observed in the 2 groups treated with ozone (p=0.033) and also a greater number of blood vessels (p=0.017) and polymorphonuclear cells (p=0.009) in group 2. On the tension side, there was a significantly higher number of blood vessels (p=0.036), osteoblasts (p=0.023) and mononuclear cells (p=0.006) in group 2. At 5 days on the pressure side, a number significantly greater number of osteoclasts (p=0.029) in group 2, blood vessels (p=0.007) and osteoblasts (p=0.028) in the 2 groups treated with ozone and lesser number of polymorphonuclear cells (p=0.049) in group 3. On the tension side, the number of blood vessels in group 3 was statistically lower than in the other groups (p=0.019). Group 1, on the other hand, had a greater number of polymorphonuclear and mononuclear cells than in the other groups. There was formation of osteoid tissue and significantly fewer hyaline areas in the two ozone groups compared to the control group. There was greater root resorption at 5 days for the groups treated with ozone therapy in both concentrations compared to the control. **Conclusion:** Ozone therapy increased the number of cells on the tension and pressure sides at the concentration of 10 µg/ml, demonstrating histological parameters favorable to osteoremodelling.

Keywords: Orthodontic Movement. Ozone. Orthodontics.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados da comparação entre as duas concentrações de ozônio e o controle, no tempo 3 dias (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn).33
- Tabela 2 - Resultados da comparação entre as diversas concentrações de ozônio e o controle, no tempo 5 dias (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn).34
- Tabela 3 - Resultado da comparação intergrupos da presença de hialinização no lado de pressão (teste qui-quadrado).....36
- Tabela 4 - Resultado da comparação intergrupos da presença de tecido osteoide no lado de tensão (teste qui-quadrado).36
-
-

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estabilização do animal.....	23
Figura 2	- Inserção do fio de amarrilho entre os molares	23
Figura 3	- Confeção da canaleta para estabilização do fio de amarrilho	24
Figura 4	- Mensuração da força aplicada através do tensiômetro	24
Figura 5	- Aspecto da mola colocada antes da inserção de resina	25
Figura 6	- Colocação da resina fotopolimerizável.....	25
Figura 7	- Mola instalada	26
Figura 8	- Momento da aplicação de ozônio.....	27
Figura 9	- Representação esquemática da movimentação dentária e local de avaliação dos cortes histológicos.....	28
Figura 10	- Gráfico obtido a partir das médias de cada grupo, aos 3 dias	33
Figura 11	- Gráfico obtido a partir das médias de cada grupo no lado de tensão, aos 3 dias.....	34
Figura 12	- Gráfico obtido a partir das médias de cada grupo no lado de pressão, aos 5 dias.....	35
Figura 13	- Gráfico obtido a partir das médias no lado de tensão, aos 5 dias	35
Figura 14	- Lado de pressão do grupo 1 aos 3 dias. Presença de tecido conjuntivo frouxo desorganizado, com fibroblastos ovais	37
Figura 15	- Lado de pressão do grupo 2 aos 3 dias. Presença de tecido frouxo, com fibras desorganizadas, fibroblastos ovoides ou estrelados e ausência de área hialina.	37
Figura 16	- Lado de pressão do grupo 3 aos 3 dias. Tecido conjuntivo denso e com fibroblastos fusiformes. Ausência de área hialina.....	38
Figura 17	- Lado de pressão do grupo 1 aos 5 dias. Presença de fibras colágenas densas e fibroblastos ovoides.....	38

Figura 18 - Lado de pressão do grupo 2 aos 5 dias. Presença de tecido conjuntivo frouxo, desorganizado, bem celularizado, com células jovens e fibroblastos ovoides.	39
Figura 19 - Lado de pressão do grupo 3 aos 5 dias. Presença de tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos ovoides e estrelados.	39
Figura 20 - Lado de tensão do grupo 1 aos 3 dias. Presença de tecido conjuntivo frouxo desorganizado, com fibroblastos ovais.	40
Figura 21 - Lado de tensão do grupo 2 aos 3 dias. Tecido conjuntivo mais denso, com fibroblastos fusiformes, presença de tecido osteoide, que indica início da neoformação óssea.	40
Figura 22 - Lado de tensão do grupo 3 aos 3 dias. Presença de tecido conjuntivo mais denso, com fibras mais organizadas e mais densas, fibroblastos fusiformes.	41
Figura 23 - Lado de tensão do grupo 1 aos 5 dias. Tecido conjuntivo denso, com fibras colágenas densas, fibroblastos fusiformes e presença de focos inflamatórios.	41
Figura 24 - Lado de tensão do grupo 2 aos 5 dias. Tecido conjuntivo com áreas de fibras densas, fibroblastos fusiformes e sem presença de inflamação.	42
Figura 25 - Lado de tensão do grupo 3 aos 5 dias. Tecido conjuntivo mais denso com fibras mais organizadas e fibroblastos fusiformes, acompanhando a disposição das fibras.	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	PROPOSIÇÃO	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	MATERIAL.....	21
3.1.1	Animais e justificativa para tamanho da amostra (n=8).....	21
3.2	MÉTODOS	22
3.2.1	Movimento Dentário Experimental.....	22
3.2.2	Aplicação de Ozônio.....	26
3.2.3	Preparo das Peças para Avaliação Histológica	27
3.3	MÉTODO ESTATÍSTICO	28
3.3.1	Erro do Método	28
3.3.2	Análise Estatística	29
4	RESULTADOS	31
5	DISCUSSÃO	44
5.1	MÉTODOS	44
5.2	RESULTADOS	45
5.3	CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS.....	47
6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A ortodontia moderna busca técnicas auxiliares que visam agilizar o tratamento ortodôntico. Técnicas cirúrgicas, como as corticotomias (PATTERSON et al., 2016) e as terapias minimamente invasivas, como a piezo incisão (HOFFMANN et al., 2017) e as microperfurações ósseas (MPOs) (SUGIMORI et al., 2018), prometem a aceleração do movimento ortodôntico. Também são citados métodos não cirúrgicos como o laser de baixa potência (LONG et al., 2012; TORRI; WEBER, 2013), e dispositivos extra ou intraorais geradores de vibração (KATCHOOI et al., 2018). Todas essas terapias prometem recrutar células importantes para a eficiência da movimentação dentária. Novas técnicas continuam sendo experimentadas (GÜLEÇ et al., 2017), porém a técnica mais eficiente para aceleração do movimento ortodôntico continua sendo a corticotomia (LONG et al., 2012).

Buscando-se uma alternativa menos invasiva para agilizar o tratamento ortodôntico, pensou-se na ozonioterapia. Esta terapia foi aprovada pelo CFO (Resolução 166/novembro 2015) para complementar os procedimentos odontológicos. Seus benefícios (bactericida, imuno-estimulador, anti-inflamatório, cicatrizante) já são comprovados e amplamente utilizados nas especialidades de endodontia, dentística, periodontia e cirurgia (NOGALES et al., 2016; STÜBINGER; SADER; FILIPPI, 2006; TIWARI et al., 2017). Diversos protocolos já foram definidos (ISCO3, 2015) através de estudos realizados nestas áreas, porém faltam estudos na ortodontia no que diz respeito à movimentação ortodôntica.

A ozonioterapia tem como uma de suas características a bioestimulação, que é o recrutamento de células importantes do sistema imunológico através de uma reação bioquímica complexa de oxirredução (CRUZ GUERRA et al., 1997). Desta forma, a ozonioterapia pode atuar modulando respostas inflamatórias, melhorando processos de reparação (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015), estimulando ou até mesmo suprimindo o sistema imunológico (KUMAR et al., 2014).

Comprovou-se também que a terapia medicinal com ozônio aumenta o número de mediadores inflamatórios como as interleucinas [II] 1 β , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral α (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015) e citocinas (ARSALANE et

al., 1995; MURPHY et al., 2016; PAULESU; LUZZI; BOCCI, 1991), que são importantes para a movimentação dentária. Além de induzir a síntese dessas importantes citocinas, o ozônio também tem ação analgésica (KUMAR et al., 2014; RODRIGUES, 2016), promovendo excelente microcirculação (AZARPAZHOOH et al., 2009; BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015; CRUZ GUERRA et al., 1997) e aumentando o número de osteoblastos e osteoclastos quando utilizado em baixa concentração (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015). A ozonioterapia vem sendo utilizada para regeneração óssea de hérnias de disco (MAGALHAES et al., 2012), terapias de estímulo da regeneração óssea em suturas intermaxilares (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015) e analgesia promovida por modulação da inflamação (KUMAR et al., 2014).

A obtenção do ozônio no consultório odontológico é realizada através de um gerador que, a partir do oxigênio medicinal e descargas elétricas geram moléculas de ozônio. É um tratamento de fácil aceitação e rápida aplicação, viável como terapia complementar (TIWARI et al., 2017).

Ainda não existem estudos conhecidos verificando os efeitos do ozônio na movimentação dentária induzida. Na ortodontia, apenas um estudo avaliou a ação do gás após disjunção maxilar em ratos e encontrou maior regeneração óssea durante a expansão maxilar no período de contenção, na concentração de 25 µg/mL (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015). Alguns estudos de ortodontia também avaliaram ação bactericida do ozônio através da utilização da água ozonizada. O uso da água ozonizada foi avaliada antes da colagem de braquetes com a finalidade de melhorar a adesividade porém, o estudo não mostrou resultados significantes (ALKAN et al., 2017). A ação da água ozonizada também foi testada durante o tratamento ortodôntico, para diminuir a gengivite, comparando-a à clorexidina, e mostrou-se superior a esta (COSOLA et al., 2019).

Devido às vantagens descritas na literatura sobre a ozonioterapia e a ausência de estudos sobre o assunto, aliadas à segurança de aplicação e ao baixo custo da terapia, geraram a motivação para condução deste estudo.

Desta forma, o presente estudo buscou avaliar a influência do ozônio durante os primeiros dias de movimentação dentária induzida em um modelo animal.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar histologicamente a influência da aplicação local de ozônio no movimento dentário induzido em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório do Centro de Pesquisas Odontológicas da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic Campinas-SP. Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas vigentes do Conselho Nacional de Controle Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (parecer CEUA 2018/043). Este estudo está de acordo com o ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiment*).

3.1.1 Animais e justificativa para tamanho da amostra

O cálculo amostral foi conduzido no programa G*Power 3.1.5, adotando-se o modelo de análise de variância. Para o tamanho do efeito de 0,84, obtido a partir das médias e desvios padrão apresentados em estudo prévio correlato (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015), nível de significância de 5%, poder de 80% e fator de perda de 0,2, o cálculo amostral indicou a necessidade de que no presente estudo houvesse oito animais em cada grupo, sendo quatro animais em cada um dos seis subgrupos, formados pela combinação dos três tratamentos e dos 2 tempos. No total, portanto, foram necessários 24 animais.

Vinte e quatro *Rattus norvegicus*- Wistar, machos, pesando em torno de 300g cada e com aproximadamente 3 meses de vida, foram provenientes do biotério Centro de Pesquisas Odontológicas da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic Campinas-SP e mantidos em ambiente em condições controladas de 12 h de luz e 12 h no escuro e sob temperatura constante de 23°C, alimentados com ração triturada e água *ad libitum*.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Movimento Dentário Experimental

Os animais foram distribuídos em 3 grupos de acordo com a aplicação ou não de ozônio e variação em sua concentração (n=8).

O grupo 1 (controle) recebeu apenas a mola para movimentação dentária induzida. O grupo 2 recebeu a mola mais aplicação de gás ozonizado com concentração de 10 µg/ml. O grupo 3 recebeu a mola e aplicação de gás ozonizado com concentração de 60 µg/ml. Em todos os grupos, metade dos animais (n=4) foram eutanasiados 3 dias após a realização do procedimento e os demais, 5 dias após.

Para a colocação do dispositivo ortodôntico, os animais estavam anestesiados com mistura de anestésico e relaxante muscular na dosagem apropriada (xilazina 12 mg/kg – via intraperitoneal e ketamina 90 mg/kg – via intraperitoneal aplicados com seringa de 1ml). Os animais foram colocados em uma maca que proporcionava a abertura bucal através de 2 extremidades fixas e colocação de elásticos intermaxilares (Figura 1).

Para a movimentação ortodôntica, foi utilizada a inclinação mesial do primeiro molar superior direito, utilizando-se um dispositivo idealizado por Heller e Nanda (HELLER; NANDA, 1979), com algumas adaptações. O dispositivo ortodôntico foi constituído de uma mola fechada de NITI de 7mm de comprimento (Orthometric, Marília, Brasil) e amarilhos de 0,020mm de espessura nas extremidades (Morelli, Sorocaba, Brasil).

Na região posterior, o amarrilho foi inserido interproximalmente entre o primeiro e segundo molares superiores, ao redor da área cervical do primeiro molar (Figura 2). Na região anterior, o amarrilho foi preso contornando o incisivo central superior direito, onde foi confeccionada uma canaleta com disco de carborundum próximo à margem gengival (Figura 3). Neste momento a força era medida através de um tensiômetro de precisão (Zeusan, Campinas, Brasil) (Figura 4), onde a outra extremidade do dispositivo era inserida na canaleta (Figura 5) e, logo após, era protegida por resina composta fotoativada (Filtek Z350 XT, 3M, Sumaré, Brasil) após condicionamento com

adesivo autocondicionante (Single Bond Universal, 3M, Sumaré, Brasil) (Figura 6). Dessa forma a mola ortodôntica era instalada (Figura 7).

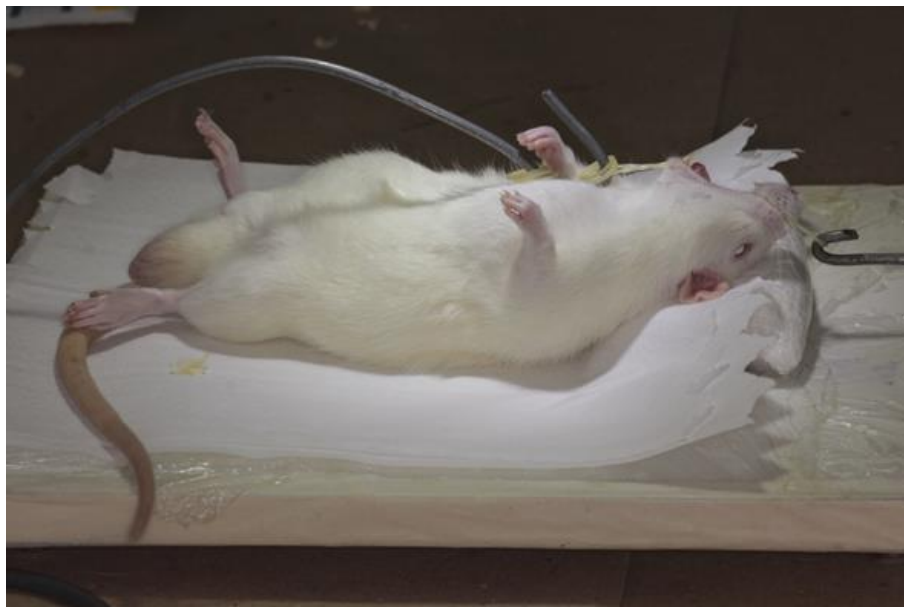


Figura 1 – Estabilização do animal.

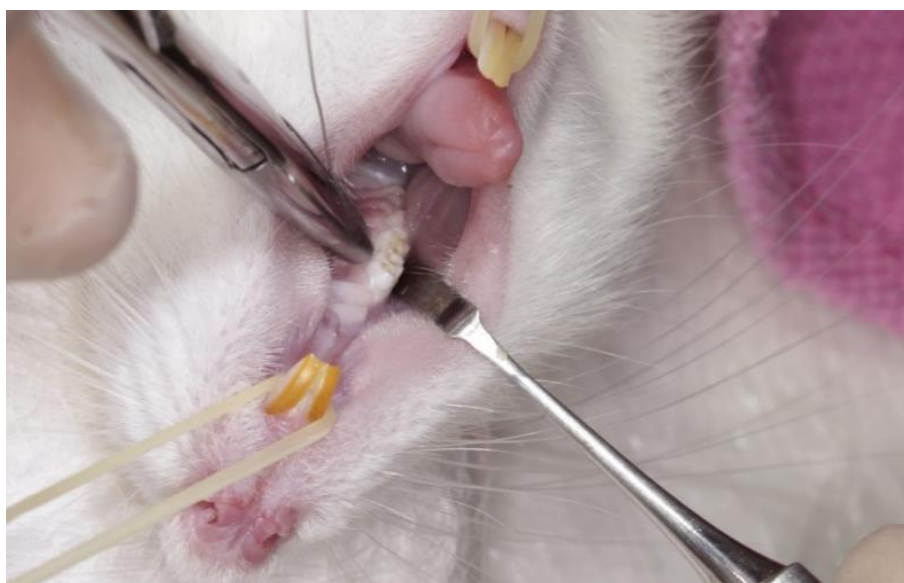


Figura 2 – Inserção do fio de amarelo entre os molares.



Figura 3 - Confeção da canaleta para estabilização do fio de amarrilho.



Figura 4 - Mensuração da força aplicada através do tensiômetro.

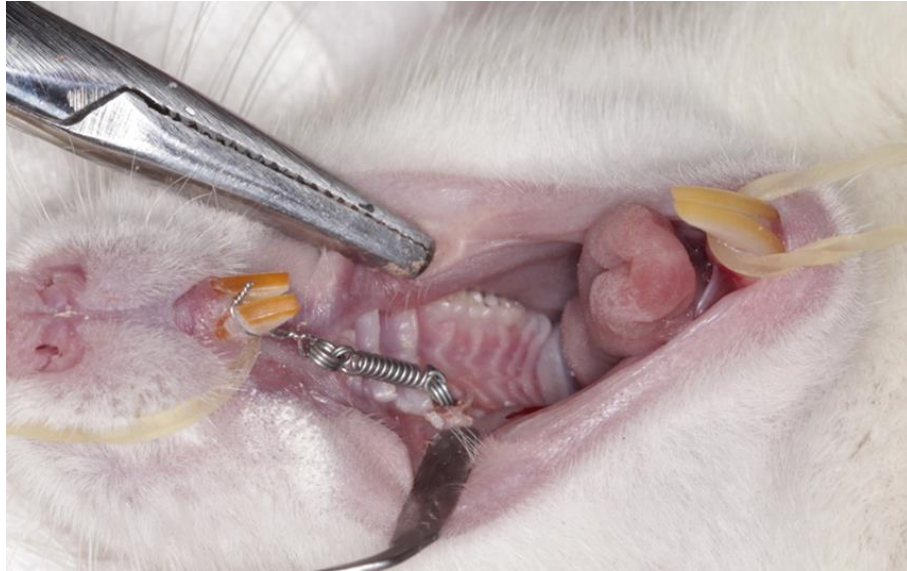


Figura 5 - Aspecto da mola colocada antes da inserção de resina.



Figura 6 - Colocação da resina fotopolimerizável.

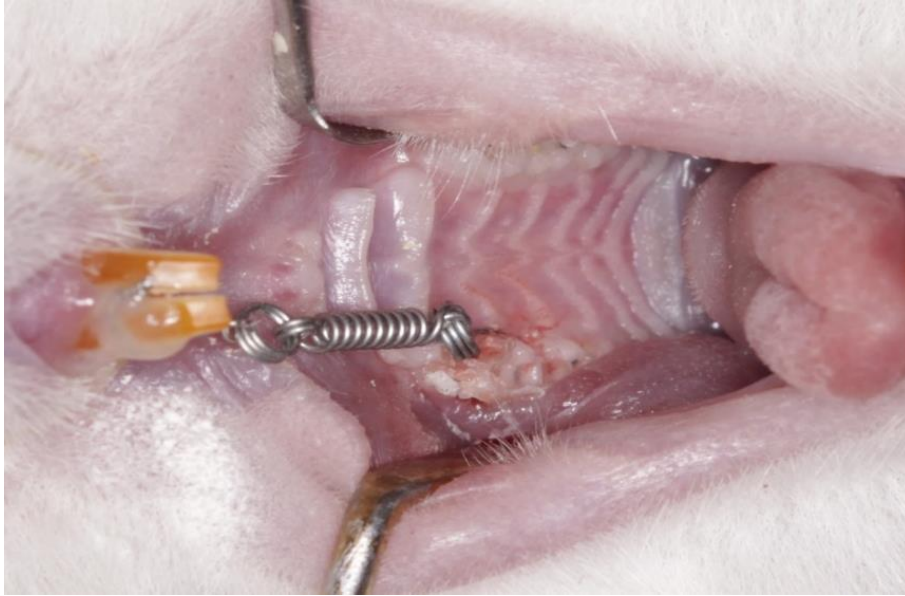


Figura 7 - Mola instalada.

3.2.2 Aplicação de Ozônio

Foi utilizado um gerador de Ozônio da marca comercial PHILOZON (Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil) para obtenção de gás ozonizado nas concentrações de 10 µg/ml e 60 µg/ml. Este aparelho apresenta autocalibração, com estabilização automática. O oxigênio medicinal utilizado (99,5%, White Martins, Rio de Janeiro, Brasil) têm fluxo regulado em 1 L/min. O gerador dispensava o gás diretamente em uma seringa siliconada estéril de 1mL (Solidor, Osasco, São Paulo, Brasil). Na seringa era acoplada uma agulha descartável 0,30 x 13mm (BD, Curitiba, Paraná, Brasil).

Nos grupos 2 e 3, foi aplicado 1mL de gás ozonizado na região de fundo de sulco dos primeiros molares superiores. Para tal fim, apenas o bisel da agulha foi inserido. A terapia foi realizada apenas uma vez, após a colocação da mola, com os animais ainda anestesiados (Figura 8).

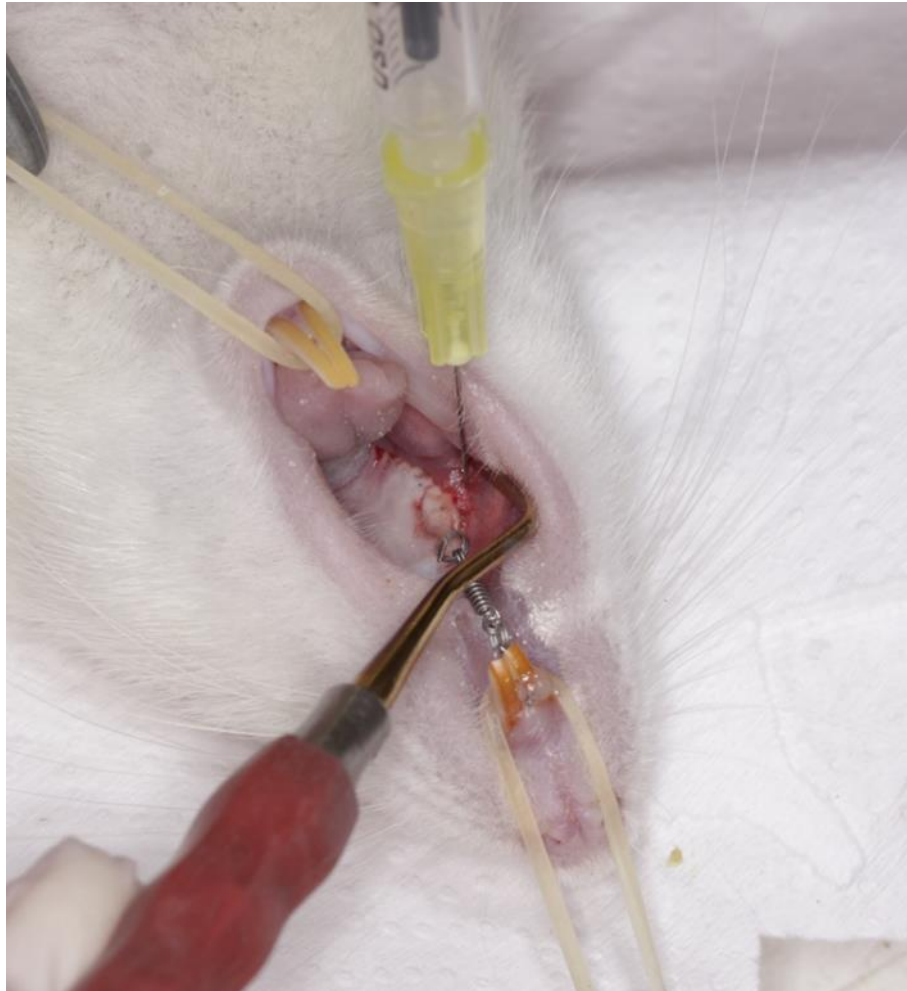


Figura 8 - Momento da aplicação de ozônio.

3.2.3 Preparo das Peças para Avaliação Histológica

Os animais foram eutanasiados após 3 e 5 dias por sobredose anestésica de tiopental sódico a 150 mg/kg via intraperitoneal, 10 minutos antes da aplicação do tiopental foi aplicado lidocaína 10mg/ml via intraperitoneal. Realizada a eutanásia, as amostras obtidas da região maxilar foram fixadas em formol tamponado 10% durante 24h e, na sequência, submetidas à descalcificação em uma solução de ácido fórmico 20% (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 7 dias. Após a remoção da mineralização, as peças foram desidratadas, diafanizadas e inseridas em parafina a fim de viabilizar cortes histológicos com espessuras de 4 μ m. As secções foram longitudinais ao longo eixo do primeiro molar superior direito, no sentido mesiodistal. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para análise dos principais aspectos histológicos. Foram avaliadas a face mesial da

raiz distovestibular, que fez referência ao lado de pressão, e a face distal da raiz mesial, fazendo referência ao lado de tensão (Figura 9). As avaliações consideraram o padrão de reabsorção e neoformação óssea nos respectivos lados de pressão e tensão da movimentação dentária. Foram avaliados o número de vasos sanguíneos formados, o número de osteoclastos e osteoblastos, os pontos de reabsorção radicular, o número de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares e a presença de tecido osteoide (tensão) e áreas hialinas (pressão) das áreas em questão. As análises microscópicas morfológica e histomorfométrica foram feitas em microscópio óptico (Microscópio óptico Medilux DI-116B), por um avaliador cego e calibrado.

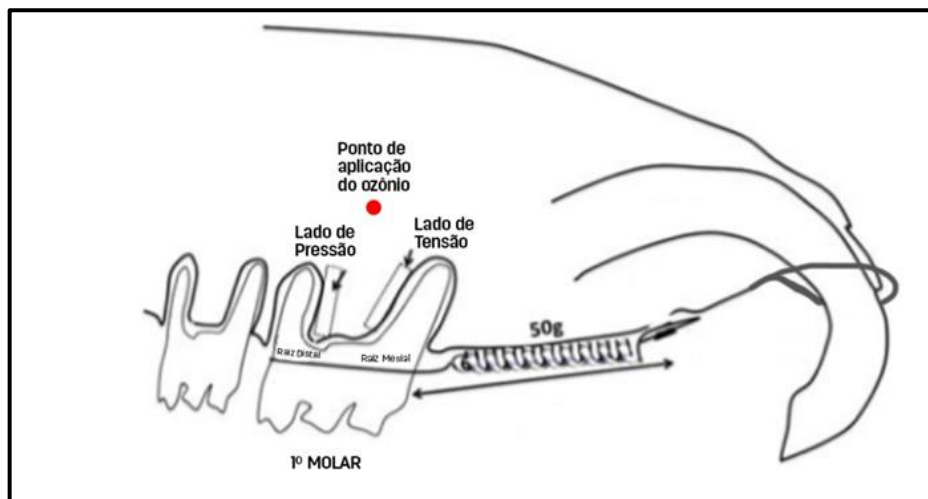


Figura 9 - Representação esquemática da movimentação dentária e local de avaliação dos cortes histológicos.

3.3 MÉTODO ESTATÍSTICO

3.3.1 Erro do Método

Para a avaliação do erro intraexaminador, 30% das lâminas foram selecionadas aleatoriamente e reavaliadas após o intervalo de 1 mês. Foram utilizados os testes Kappa e coeficiente de correlação intraclassa (ICC), e ambos mostraram grau de confiabilidade bom a excelente para todas as variáveis analisadas.

3.3.2 Análise Estatística

A análise estatística constituiu-se de avaliação qualitativa e quantitativa dos dados obtidos.

A comparação da contagem do número de osteoclastos, vasos, áreas de reabsorção, números de osteoblastos, células polimorfonucleares e células mononucleares nos lados de pressão e tensão foram comparadas entre as duas concentrações de ozônio e o controle em cada tempo (3 e 5 dias separadamente) foram realizadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

A comparação da presença ou não de áreas de hialinização no lado de pressão e de tecido osteoide no lado de tensão dentre as duas concentrações de ozônio e o controle em cada tempo (3 e 5 dias separadamente) foram realizadas pelo teste não paramétrico qui-quadrado.

Os testes foram realizados com auxílio do software Statistica (versão 10.0, Statsoft, Tulsa, Oklahoma, EUA) e os dados foram considerados significantes para $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Lado de pressão:

No período de 3 dias, no grupo 2 (10 µg/mL) notou-se um número significativamente maior de osteoclastos, vasos sanguíneos e células inflamatórias polimorfonucleares quando comparado ao grupo 1 (grupo controle). No grupo 3 (60 µg/mL) notou-se quadro semelhante em relação aos osteoclastos, com a presença de um número estatisticamente maior quando comparado ao grupo controle. O grupo 2 apresentou número significativamente maior da vascularização e células polimorfonucleares em relação aos grupos 1 e 3 (Tabela 1). Além disso, no grupo 1 observou-se predomínio de área hialina e discreto tecido conjuntivo frouxo desorganizado com fibroblastos ovoides (Figura 14). Já no grupo 2, observou-se ausência das áreas hialinas e predomínio do tecido conjuntivo frouxo celularizado, com fibras desorganizadas, bem como fibroblastos ovoides ou estrelados (Figura 15). No grupo 3, o tecido conjuntivo apresentou-se mais organizado, denso e com fibroblastos fusiformes, além da ausência das áreas hialinas (Figura 16).

Semelhante ao período de 3 dias, no tempo de 5 dias, no grupo 2 observou-se número significativamente maior de vasos sanguíneos neoformados e células polimorfonucleares, osteoclastos e osteoblastos quando comparado com o grupo controle. No entanto, neste tempo de 5 dias, também se notou significativamente mais pontos de reabsorção dentária no grupo 2 em relação ao controle; fato não observado aos 3 dias de movimentação dentária (Tabela 2). Aos 5 dias, nas áreas de pressão do grupo 1, as fibras colágenas apresentavam-se densas com fibroblastos ovoides e por vezes fusiformes, além da ausência de áreas hialinas (Figura 17). No grupo 2, houve presença de tecido conjuntivo frouxo desorganizado, bem celularizado, marcado pelos fibroblastos ovoides jovens (Figura 18). No grupo 3, presença de tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos ovoides e estrelados (Figura 19).

Nenhuma amostra dos grupos onde foi realizada Ozonioterapia apresentou formação de área hialina (Tabela 3).

Lado de tensão:

No período de 3 dias, o grupo 1 (controle), a formação de um ponto de tecido osteoide foi evidenciada em apenas uma das amostras (Tabela 4), somado à presença de um tecido conjuntivo ainda frouxo desorganizado e com fibroblastos ovais jovens (Figura 20). Para o mesmo período, o grupo 2 apresentou significativamente mais vascularização, células mononucleares e osteoblastos em relação aos grupos controle e grupo 3 (Tabela 1). Conseqüentemente, neste grupo (2) observou-se áreas de tecido osteoide, indicando início da neoformação óssea, além do predomínio de tecido conjuntivo denso e fibroblastos fusiformes (Figura 21). No grupo 3, houve a presença de tecido conjuntivo denso organizado e fibroblastos fusiformes (Figura 22).

No entanto, aos 5 dias, ambos os grupos 2 e 3, tratados com ozonioterapia, apresentaram número significativamente menor de células polimorfo e mononucleares em relação ao controle. Além disso, o grupo 3 mostrou menor vascularização comparado com os demais grupos (Tabela 2). Assim, o grupo 1 apresentou fibras colágenas densas com fibroblastos fusiformes, porém, ainda com a presença de focos inflamatórios (Figura 23). Em contrapartida, os grupos 2 e 3 apresentaram tecido conjuntivo com fibras colágenas densas e fibroblastos fusiformes acompanhando a disposição das fibras, marcados pela ausência de áreas de inflamação (Figuras 24 e 25).

Todas as amostras onde foi realizada Ozonioterapia apresentaram formação de tecido osteoide a partir dos 3 dias, diferentemente do grupo controle, onde apenas uma amostra apresentou esta formação (Tabela 4).

Tabela 1. Resultados da comparação entre as duas concentrações de ozônio e o controle, no tempo 3 dias (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn).

Variáveis	G1 (Controle)		G2 (10 µg/mL)		G3 (60 µg/mL)		P
	Média (Mediana)	d.p. (d.i.)	Média (Mediana)	d.p. (d.i.)	Média (Mediana)	d.p. (d.i.)	
LADO PRESSÃO							
Osteoclastos	2,0 (1,5) A	1,4 (2,0)	6,3 (6,5) B	1,0 (1,5)	6,5 (5,5) B	3,3 (5,0)	0,033*
Vasos	8,0 (8,5) A	2,9 (4,0)	20,3 (19,0) B	4,0 (5,5)	6,8 (7,0) A	0,5 (0,5)	0,017*
Reabsorção	0,2 (0,0)	0,5 (0,5)	1,0 (0,5)	1,4 (2,0)	1,3 (1,5)	1,0 (1,5)	0,328
Osteoblastos	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	2,8 (2,5)	3,2 (5,5)	3,5 (4,5)	2,4 (3,0)	0,157
Cél. polimorfos nucleares	0,2 (0,0) A	0,5 (0,5)	18,5 (21,5) B	9,7 (14,0)	0,0 (0,0) A	0,0 (0,0)	0,009*
Células mononucleares	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	6,5 (7,0)	5,2 (8,0)	3,5 (4,0)	3,0 (5,0)	0,081
LADO TENSÃO							
Osteoclastos	1,2 (1,0)	1,2 (1,5)	2,3 (2,0)	1,3 (1,5)	3,3 (3,5)	1,7 (2,5)	0,192
Vasos	21,2 (23,5) A	8,6 (11,5)	32,3 (33,5) B	5,9 (7,5)	14,5 (14,5) A	3,7 (5,0)	0,036*
Reabsorção	2,0 (2,0)	1,8 (3,0)	1,3 (1,0)	0,5 (0,5)	2,5 (2,5)	2,4 (4,0)	0,829
Osteoblastos	10,0 (13,0) A	6,7 (8,0)	23,5 (21,0) B	8,5 (13,0)	9,5 (10,0) A	5,0 (7,0)	0,023*
Cél. polimorfos nucleares	1,2 (0,0)	2,5 (2,5)	4,8 (5,0)	1,5 (2,5)	1,8 (1,5)	1,7 (2,5)	0,086
Células mononucleares	0,0 (0,0) A	0,0 (0,0)	71,5 (83,0) B	39,0 (56,0)	7,8 (5,5) A	4,9 (5,5)	0,006*

* Estatisticamente significativa para $P < 0,05$.

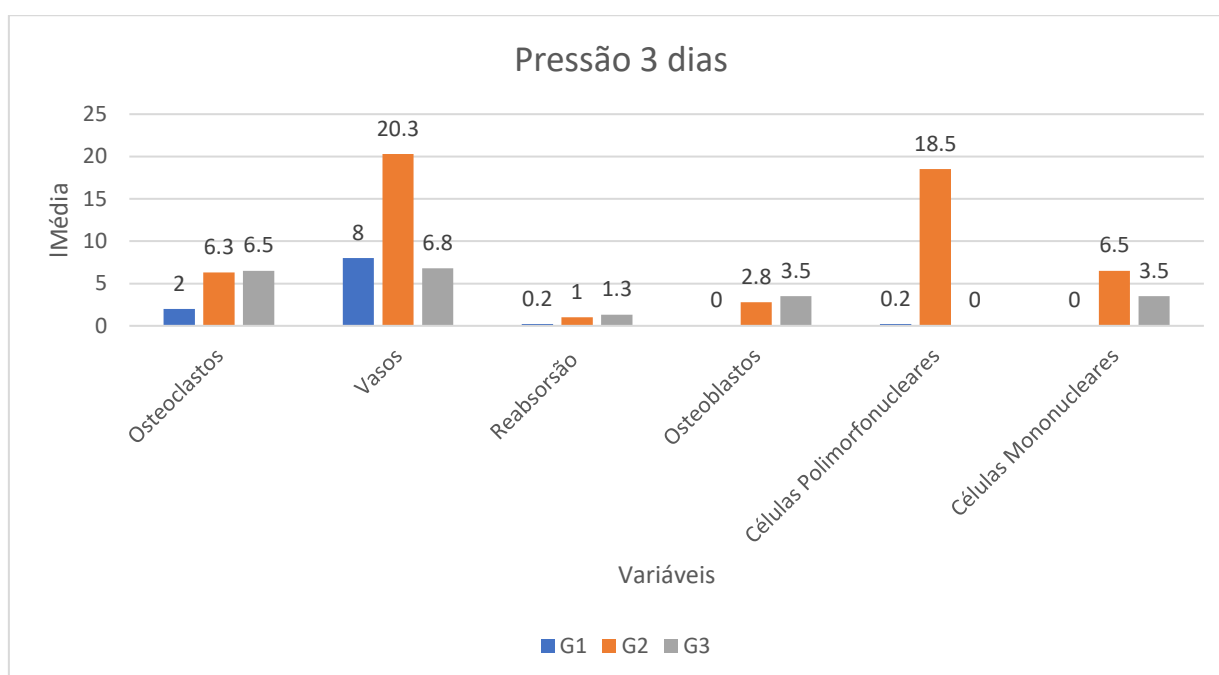


Figura 10 - Gráfico obtido a partir das médias de cada grupo, aos 3 dias.

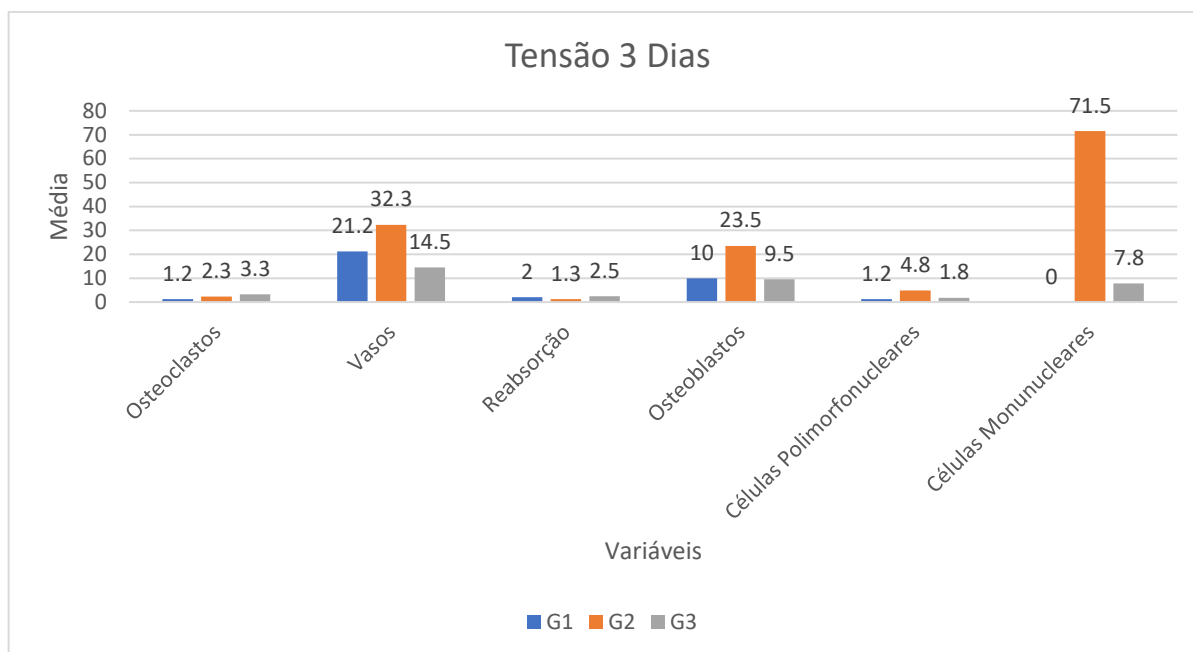


Figura 11 - Gráfico obtido a partir das médias de cada grupo no lado de tensão, aos 3 dias.

Tabela 2. Resultados da comparação entre as duas concentrações de ozônio e o controle, no tempo 5 dias (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn).

Variáveis	G1 (Controle)		G2 (10 µg/mL)		G3 (60 µg/mL)		P
	Média (Mediana)	d.p. (d.i.)	Média (Mediana)	d.p. (d.i.)	Média (Mediana)	d.p. (d.i.)	
LADO PRESSÃO							
Osteoclastos	2,3 (2,5) A	1,0 (1,5)	5,5 (5,5) B	1,3 (2,0)	3,3 (3,0) A	1,3 (1,5)	0,029*
Vasos	6,5 (6,0) A	1,9 (3,0)	14,5 (14,5) B	1,3 (2,0)	19,0 (18,5) B	2,2 (3,0)	0,007*
Reabsorção	0,3 (0,0) A	0,5 (0,5)	2,8 (2,5) B	1,0 (1,5)	2,0 (2,0) B	0,0 (0,0)	0,009*
Osteoblastos	1,5 (0,0) A	3,0 (3,0)	10,3 (9,5) B	3,4 (4,5)	10,0 (9,5) B	3,9 (6,0)	0,028*
Cél. polimorfos nucleares	2,8 (2,5) A	3,2 (5,5)	5,0 (5,0) A	2,4 (3,0)	0,0 (0,0) B	0,0 (0,0)	0,049*
Células mononucleares	3,3 (3,5)	2,8 (4,5)	7,0 (7,0)	1,2 (2,0)	3,8 (4,0)	3,0 (4,5)	0,078
LADO TENSÃO							
Osteoclastos	2,3 (1,0)	3,2 (3,5)	1,8 (2,0)	0,5 (0,5)	1,8 (1,5)	2,1 (3,5)	0,868
Vasos	28,5 (28,0) A	5,7 (7,0)	25,8 (25,5) A	1,7 (2,5)	8,5 (8,5) B	0,6 (1,0)	0,019*
Reabsorção	2,0 (1,5)	2,2 (3,0)	2,3 (2,0)	0,5 (0,5)	1,0 (1,0)	1,2 (2,0)	0,308
Osteoblastos	14,0 (13,5)	5,8 (10,0)	14,0 (15,5)	10,2 (16,0)	17,8 (18,5)	9,0 (11,5)	0,860
Cél. polimorfos nucleares	10,5 (7,5) A	9,3 (12,0)	0,0 (0,0) B	0,0 (0,0)	0,3 (0,0) B	0,5 (0,5)	0,009*
Células mononucleares	18,3 (18,0) A	1,5 (2,5)	3,5 (3,0) B	3,3 (4,0)	0,0 (0,0) B	0,0 (0,0)	0,008*

* Estatisticamente significativa para $P < 0,05$.

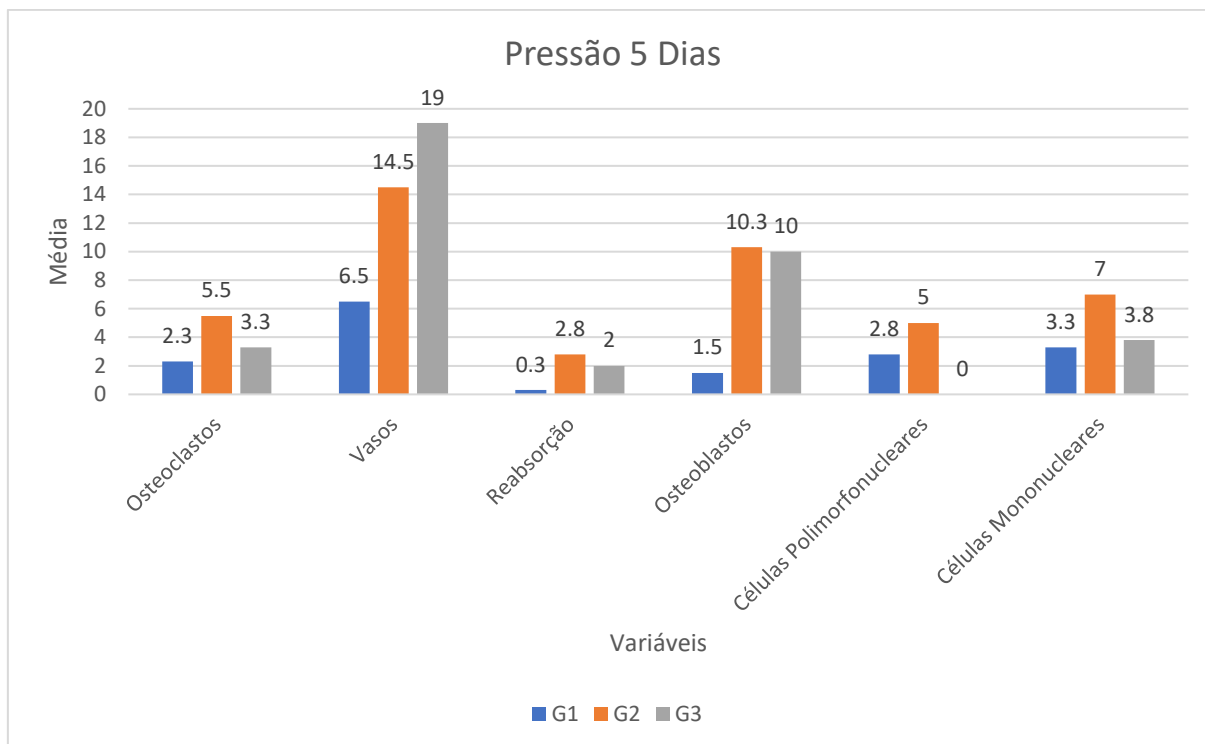


Figura 12 - Gráfico obtido a partir das médias de cada grupo no lado de pressão, aos 5 dias.

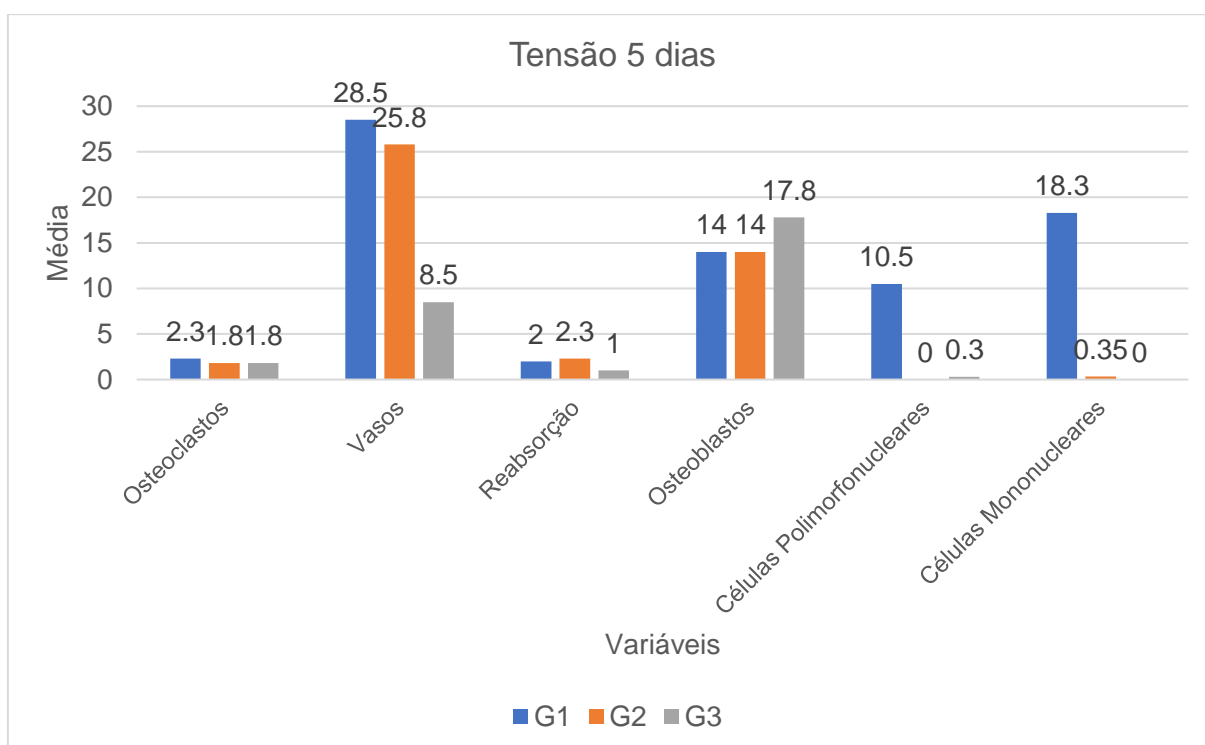


Figura 13 - Gráfico obtido a partir das médias no lado de tensão, aos 5 dias.

Tabela 3. Resultado da comparação intergrupos da presença de hialinização no lado de pressão (teste qui-quadrado).

3 e 5 DIAS			
LADO PRESSÃO			
Hialinização	Sim	Não	Total
Grupo			
Controle	4	0	4
10	0	4	4
60	0	4	4
$X^2=12,00$		$GL=2$	$P=0,002^*$

* Estatisticamente significativa para $P<0,05$.

Tabela 4. Resultado da comparação intergrupos da presença de tecido osteoide no lado de tensão (teste qui-quadrado).

3 DIAS			
LADO TENSÃO			
Tec. Osteoide	Sim	Não	Total
Grupo			
Controle	1	3	4
10	4	0	4
60	4	0	4
$X^2=8,00$		$GL=2$	$P=0,018^*$

5 DIAS			
LADO TENSÃO			
Tec. Osteoide	Sim	Não	Total
Grupo			
Controle	4	0	4
10	4	0	4
60	4	0	4

* Estatisticamente significativa para $P<0,05$.

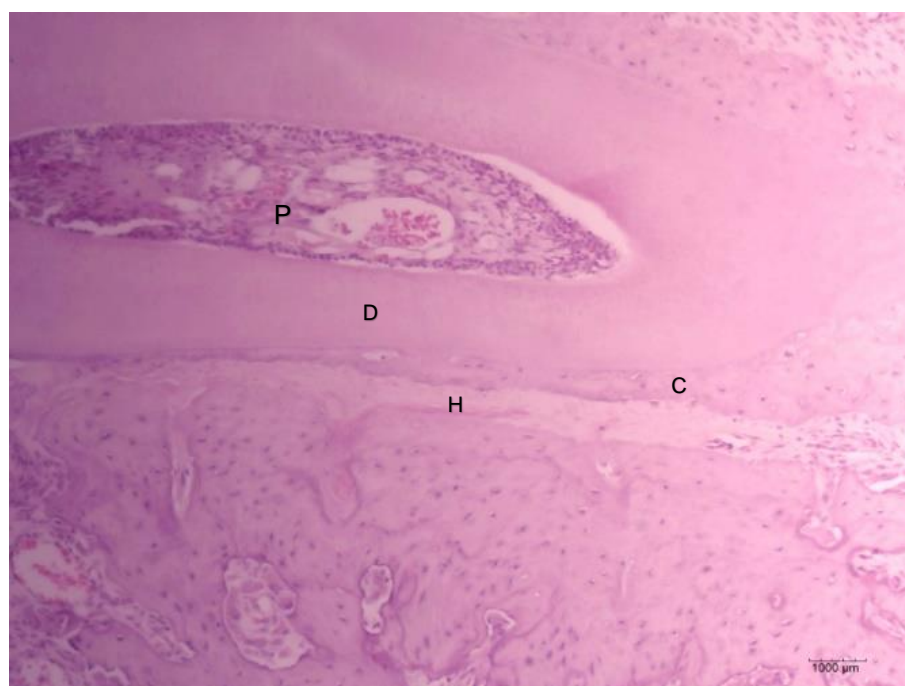


Figura 14 - Lado de pressão do grupo 1 aos 3 dias. (D) dentina, (C) cemento, (H) área hialina, (P) polpa (Hematoxilina & Eosina, x4)

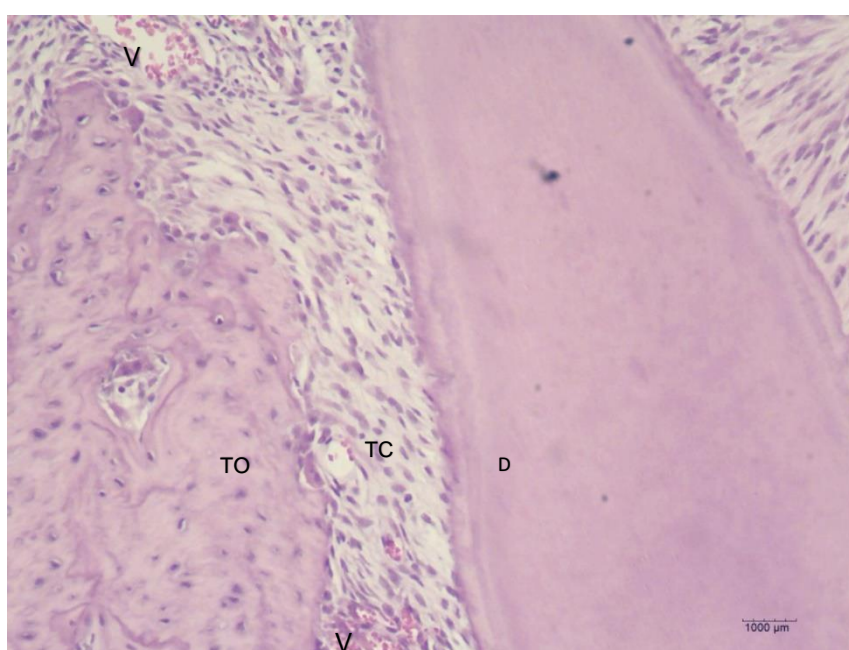


Figura 15 - Lado de pressão do grupo 2 aos 3 dias.(TO) tecido ósseo, (TC) tecido conjuntivo frouxo, com fibras desorganizadas, fibroblastos ovoides ou estrelados e ausência de área hialina, (D) dentina, (V) vasos sanguíneos (Hematoxilina & Eosina, x10).

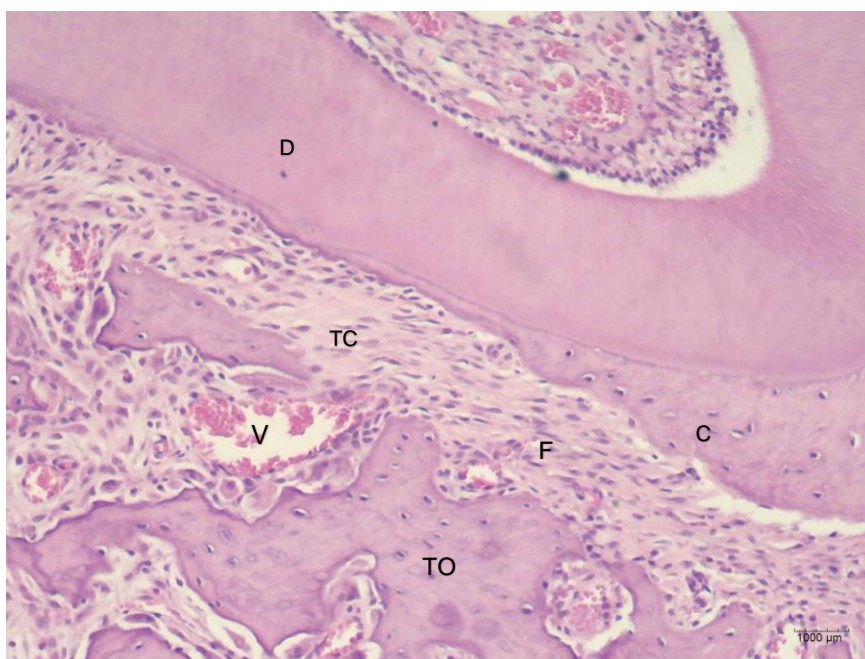


Figura 16 - Lado de pressão do grupo 3 aos 3 dias. (D) dentina, (TC) Tecido conjuntivo denso e com (F) fibroblastos fusiformes e ausência de área hialina (C) cimento, (TO) tecido ósseo (Hematoxilina & Eosina, x10)

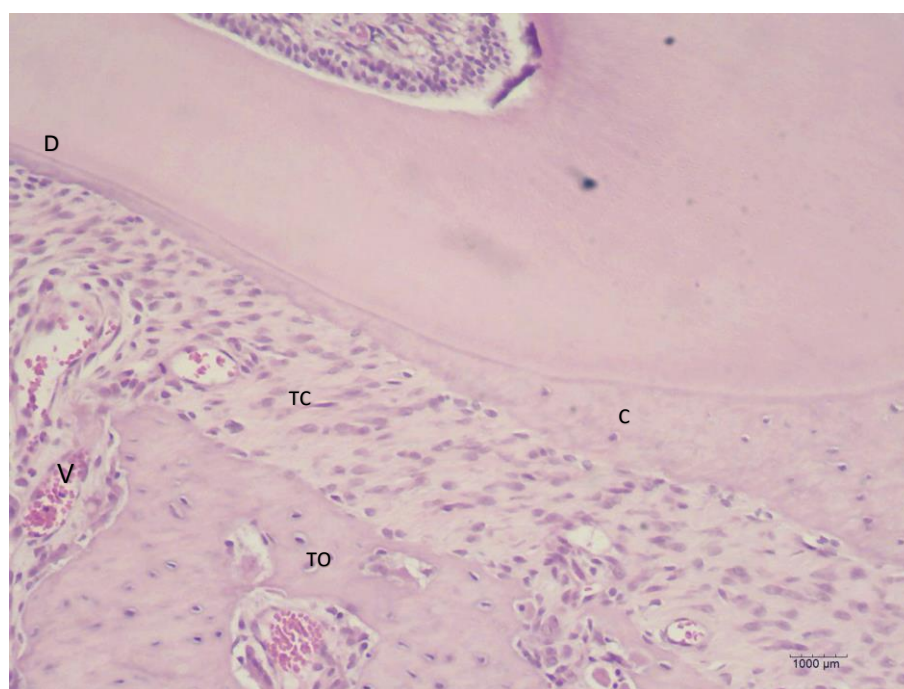


Figura 17 - Lado de pressão do grupo 1 aos 5 dias. (A) dentina, (TC) tecido conjuntivo com fibras colágenas densas e fibroblastos ovóides, (C) cimento, (TO) tecido ósseo, (V) vasos sanguíneos. (Hematoxilina & Eosina, x10).

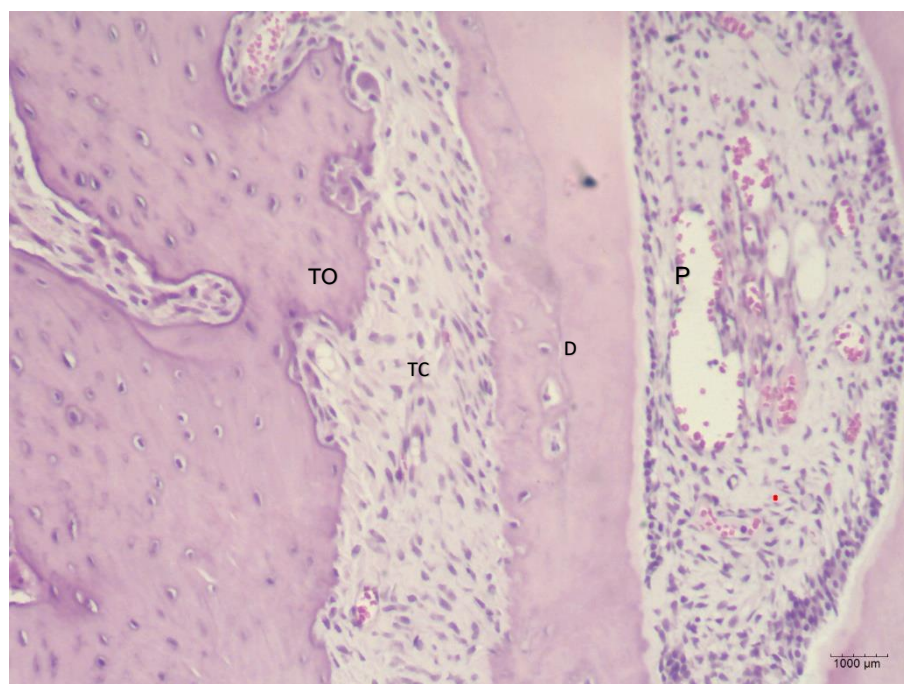


Figura 18 - Lado de pressão grupo 2 aos 5 dias. (TO) tecido ósseo, (TC) tecido conjuntivo frouxo, desorganizado, bem celularizado, com células jovens e fibroblastos ovoides, (D) dentina, (P) polpa. (Hematoxilina & Eosina, x10).

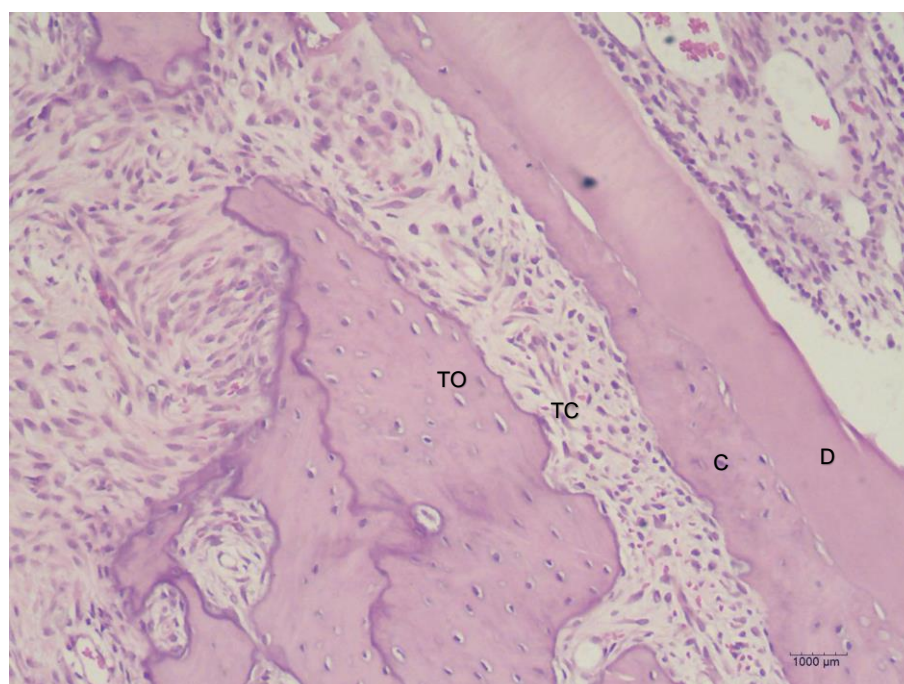


Figura 19 - Lado de pressão do grupo 3 aos 5 dias. (TO) tecido ósseo, (TC) tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos ovoides e estrelados, (C) cimento, (D) Dentina (Hematoxilina & Eosina, x10).

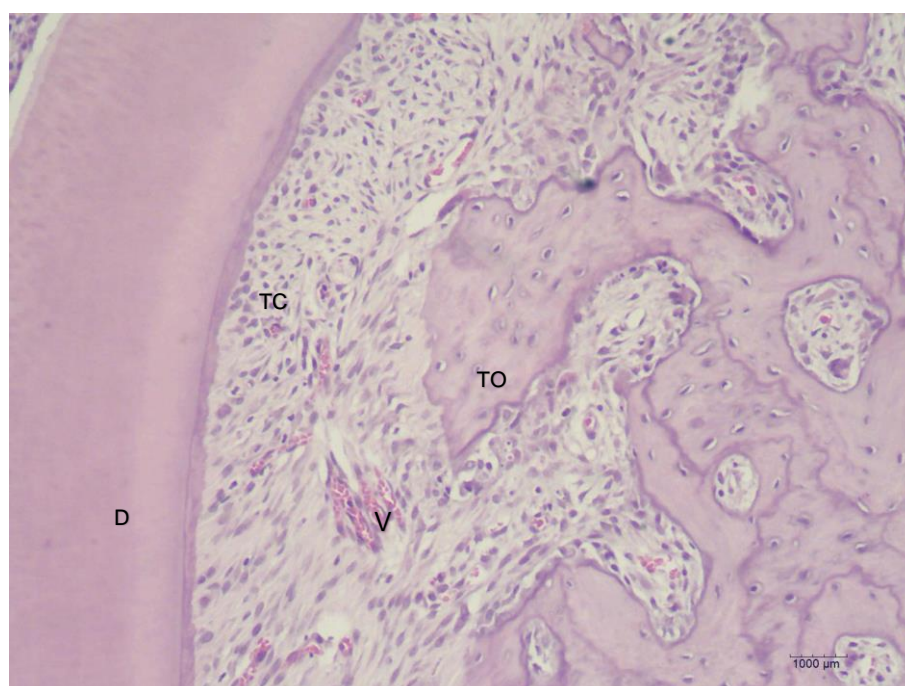


Figura 20 - Lado de tensão do grupo 1 aos 3 dias. (D) dentina, (TC) tecido conjuntivo frouxo desorganizado, com fibroblastos ovais, (TO) tecido ósseo (V) vaso sanguíneo. (Hematoxilina & Eosina, x10).

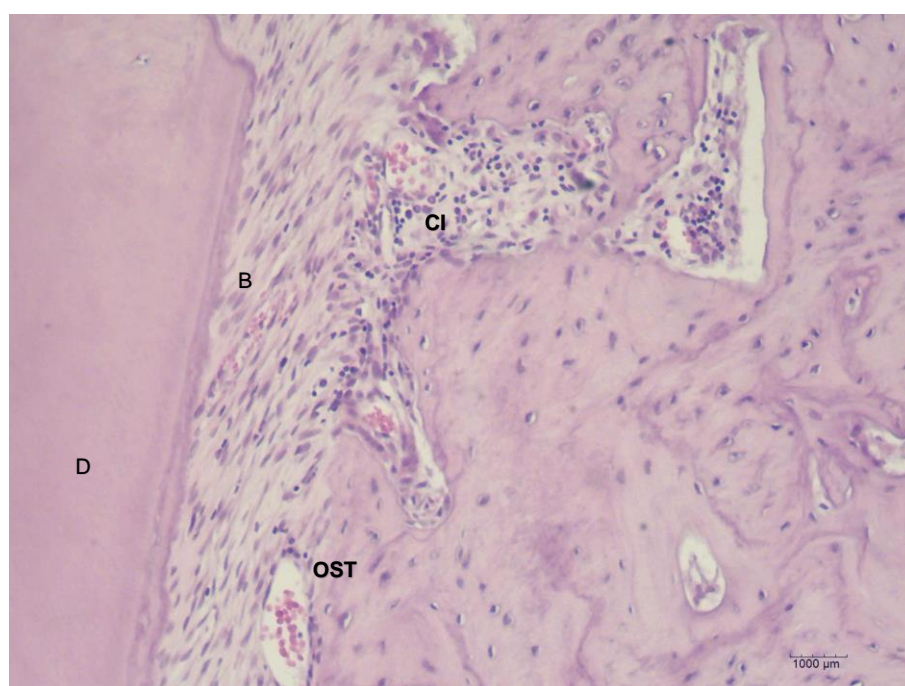


Figura 21 - Lado de tensão do grupo 2 aos 3 dias. (D) dentina, (TC) tecido conjuntivo mais denso, com fibroblastos fusiformes, (OST) presença de tecido osteoide, que indica início da neoformação óssea, (CI) células inflamatórias Hematoxilina & Eosina, x10).

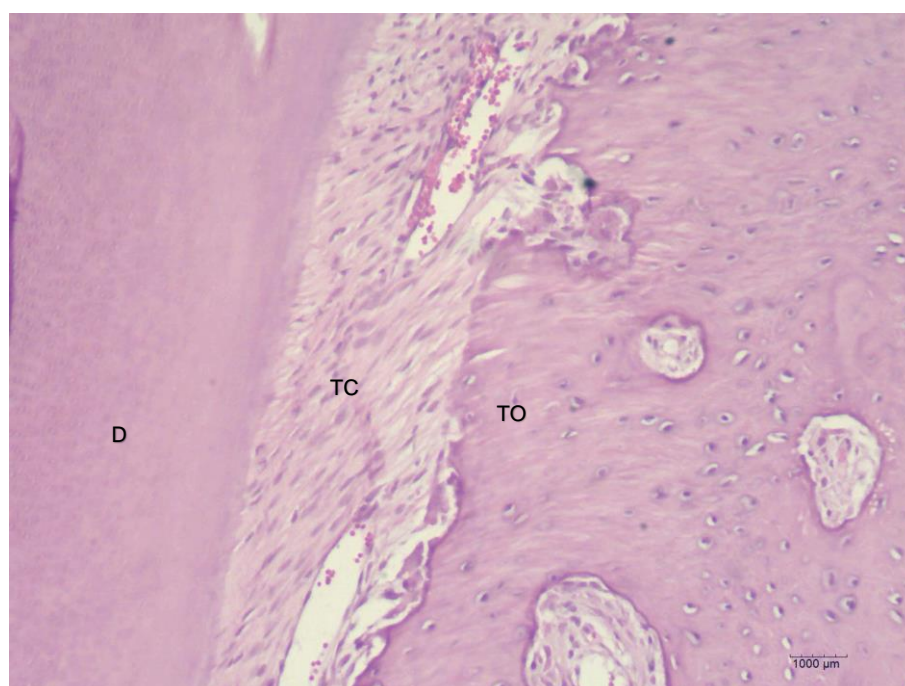


Figura 22 - Lado de tensão grupo 3 aos 3 dias. (D) dentina, (TC) tecido conjuntivo mais denso, com fibras mais organizadas e mais densas, fibroblastos fusiformes, (TO) tecido ósseo. (Hematoxilina & Eosina, x10).

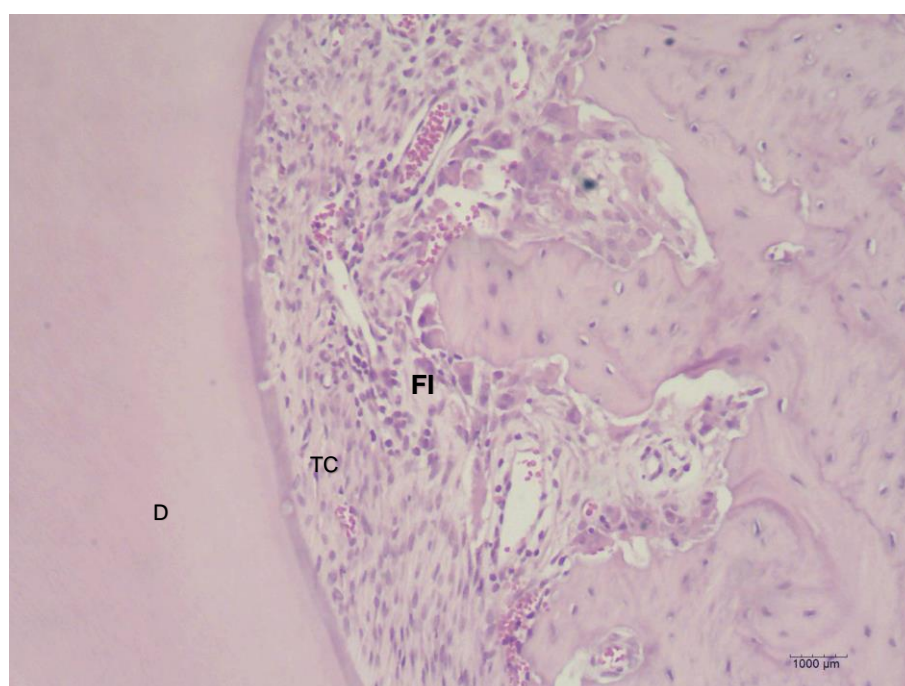


Figura 23 - Lado de tensão do grupo 1 aos 5 dias. (D) dentina, (TC) tecido conjuntivo denso, com fibras colágenas densas, fibroblastos fusiformes, (FI) presença de focos inflamatórios. (Hematoxilina & Eosina, x10).

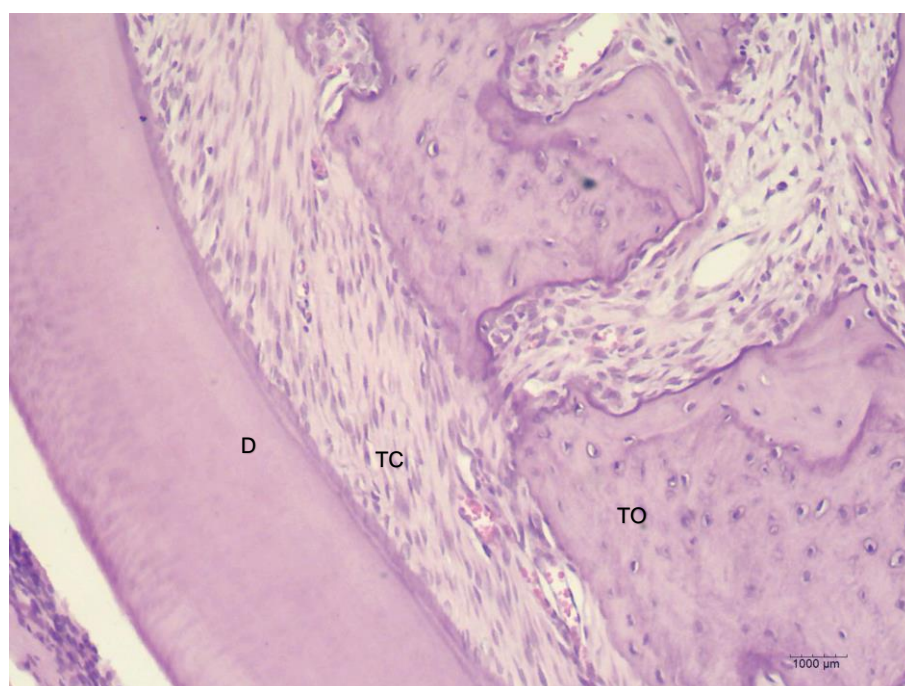


Figura 24 - Lado de tensão do grupo 2 aos 5 dias. (D) dentina, (TC) tecido conjuntivo com áreas de fibras densas, fibroblastos fusiformes e sem presença de inflamação, (TO) tecido ósseo. (Hematoxilina & Eosina, x10)



Figura 25 - Lado de tensão grupo 3 aos 5 dias. (D) dentina, (C) cimento, (TC) tecido conjuntivo mais denso com fibras mais organizadas e fibroblastos fusiformes, acompanhando a disposição das fibras, (OST) tecido osteoide, (TO) tecido ósseo. (Hematoxilina & Eosina, x10).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 MÉTODOS

As concentrações de 10 µg/mL e 60 µg/mL foram escolhidas para que fosse avaliado o efeito da Ozonioterapia na movimentação dentária induzida, pensando-se na dose por ponto de aplicação, que pode ser uma dose bioestimuladora, anti-inflamatória ou imunossupressora (TIWARI et al., 2017). Para a dose bioestimuladora, optou-se pela concentração de 10 µg/mL (MURPHY et al., 2016) ao invés de 25 µg/mL (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015) pois a primeira apresentou aumento de interleucinas importantes para a movimentação ortodôntica. Já a segunda, aumentou o processo de cicatrização óssea. A dose de 60 µg/mL foi escolhida para que se pudesse observar seu efeito frente à movimentação dentária, já que não haviam estudos prévios sobre o tema.

Calcula-se a dose em Ozonioterapia multiplicando-se os valores do volume e da concentração ($Dose = Volume \times Concentração$) e é expressa por µg. O volume considerado seguro, para seres humanos adultos pesando em torno de 70kg não poderia exceder 100 ml por sessão para aplicações subcutâneas (ISCO3, 2015), ou seja para animais de 350 g, fazendo um cálculo diretamente proporcional, o volume máximo seria de 0,5 mL. Porém, levando em consideração trabalhos já realizados em ozonioterapia com ratos, utilizou-se o volume de 1 mL (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015). Também se pensou neste volume para que fosse possível testar concentrações com diferentes funções: uma, bioestimuladora (até 50 µg/mL) e outra, antiinflamatória (entre 50 µg/mL e 150 µg/mL). Alguns animais foram perdidos durante a aplicação do ozônio (em torno de 5), os quais foram imediatamente substituídos, mantendo-se o volume da aplicação. O volume de 1 mL foi útil para facilitar a obtenção da concentração final e também para padronizar pesquisas futuras.

Não foi utilizado o índice de extrapolação alométrica neste caso, pois o ozônio não é absorvido, e sim sofre uma reação de oxirredução imediata. Este índice, leva em consideração a taxa metabólica basal de cada organismo que, no caso dos roedores, é em torno de 3x mais rápida do que a de seres humanos e por isso, as doses de medicação utilizadas normalmente são maiores (CONSOLARO, 2007).

A aplicação subcutânea foi escolhida pois é uma técnica que o ortodontista poderá realizar no consultório com facilidade para a finalidade ortodôntica, embora existam muitas formas de aplicação da Ozonioterapia (BOCCI et al., 2009).

Os períodos de acompanhamento foram de 3 e 5 dias, tendo por base estudo realizado por Fracalossi et al. (FRACALOSSO et al., 2009), que avaliou os tempos de 3, 5, 7 e 9 dias. Segundo este estudo o período de maior atividade celular na movimentação é aos 5 dias e o final da atividade celular, aos 9 dias.

Optou-se pela análise dos dias 3 e 5, pois o terceiro dia reflete o tempo de maior recrutamento celular oriundo da Ozonioterapia (NOGALES; MARTINEZ-SOBRIDO, 2017) e normalmente é um período de latência da movimentação induzida. Aos 5 dias, foi importante a avaliação da atividade dos efeitos posteriores da Ozonioterapia e dos reflexos de uma aplicação após a sua total reação. Também para comparação do período com maior quantidade de células do grupo controle, que é aos 5 dias, com os grupos onde foram aplicadas as diferentes concentrações de ozônio.

Utilizou-se a força de 50 g para realização da movimentação dentária em ratos, pois ela causa movimentação dentária e reabsorção radicular ao mesmo tempo (FONSECA et al., 2013). A escolha desta força permitiu que fosse testada a ação do ozônio frente a forças que geram reabsorções radiculares, pois especula-se que a Ozonioterapia pudesse estimular células protetoras do ligamento periodontal (cementoblastos) a defender o tecido contra a agressão.

5.2 RESULTADOS

Para o dente se movimentar, osteoclastos devem promover a reabsorção óssea ao longo do lado de compressão do ligamento periodontal enquanto que osteoblastos devem promover a neoformação óssea ao longo do lado de tensão e nas áreas de reabsorção remodeladora no lados de pressão (PROFFIT; FIELDS JR, 2000). Teoricamente podemos pensar que um maior número de células inflamatórias na região associado com o maior número de osteoclastos e osteoblastos sejam estimados para a acelerar o processo de osteorremodelação. Estes resultados foram apresentados pelo grupo de 10 µg de ozonioterapia, que apresentou número maior de

células inflamatórias no local, nos dois tempos avaliados e uma reorganização tecidual mais eficiente.

Pode-se observar claramente, que, nos grupos onde foi realizada Ozonioterapia, não houve formação de áreas hialinas, o que pode ser explicado pela maior formação de vasos sanguíneos e o consequente aumento da oferta de oxigênio (BOCCI, 2005). Este resultado é favorável para a movimentação ortodôntica. Normalmente, a situação de hipóxia ou anóxia ocorre devido à compressão do ligamento periodontal e leva à morte celular e à formação de áreas hialinas. Estas áreas hialinas são indesejáveis, pois atrasam a movimentação dentária induzida sendo necessário a fagocitose dessas áreas para o avanço das etapas do processo (CONSOLARO et al., 2011).

O maior número de células observado no grupo tratado com ozonioterapia (células polimorfonucleares, mononucleares, osteoclastos e osteoblastos) pode ser justificado pelo fato de que o ozônio ativa a angiogênese (PATTERSON et al., 2017), fazendo com que essas células consigam acessar a área de inflamação com maior facilidade. Outro fato importante citado na literatura que pode justificar o maior número de células é que o ozônio melhora a performance das hemácias que fazem o transporte de oxigênio pelos tecidos e ativa uma série de mecanismos biológicos que levam à normalização da entrega de oxigênio (BOCCI, 2006). O ozônio também aumenta a liberação de óxido nítrico (NO)(BOCCI; ZANARDI; TRAVAGLI, 2011), que melhora a vasodilatação em áreas de isquemia (LUO; CHEN, 2005), justificando o aumento da vascularização das regiões onde o ozônio foi utilizado. Por estes motivos concluímos que a força intensa que geraria uma resposta inicial necrótica, não afetou da mesma forma os grupos onde a terapia com ozônio foi realizada.

Mensageiros químicos como as citocinas, NO e prostaglandina E têm a propriedade de estimular tanto a resposta osteoclástica quanto a osteoblástica (PROFFIT; FIELDS JR, 2000). Esses mensageiros são estimulados pela ozonioterapia (AJAMIEH et al., 2004; CANNING et al., 1991; MURPHY et al., 2016).

Os resultados obtidos para o grupo 2 (10 µg/ml) foram compatíveis com trabalhos já publicados mostrando eficiência para estimular a proliferação celular (NOGALES; MARTINEZ-SOBRIDO, 2017) em terapias de osteorremodelação em hérnias lombares (MAGALHAES et al., 2012; MURPHY et al., 2016) aumento de vascularização da região tratada (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015) e células

polimorfonucleares indicando o aumento do infiltrado inflamatório na região. Essa concentração, considerada bioestimuladora, pode ser útil durante a movimentação ortodôntica, no processo de osteorremodelação.

Já no grupo 3 (60 µg/mL), a aplicação de ozônio pode ter agido como anti-inflamatória, pois já aos 3 dias a quantidade de inflamação no local era pequena ou inexistente, acompanhada pela organização do ligamento periodontal que já apresentava um tecido conjuntivo mais denso, com fibras colágenas fusiformes aos 5 dias. Para forças pesadas sem a aplicação de ozônio, a reorganização celular inicia aos 9 dias {Consolaro, 2011 #5}. Talvez essa concentração moduladora da inflamação, seja interessante para ser utilizada na estabilização de tratamento ortodônticos, pois o ligamento periodontal se reorganiza mais rapidamente.

Conforme os resultados, a reabsorção radicular também ocorreu quando foi utilizado ozônio (Tabela 3). Diferentemente da ideia de que as reabsorções dentárias poderiam ser atribuídas à eliminação das áreas hialinas (ENGSTRÖM; GRANSTRÖM; THILANDER, 1988), foi observado neste trabalho aumento dos pontos de reabsorção mesmo nos grupos com ausência dessas áreas (grupos que receberam ozônio). Outros estudos mostram que o aumento da renovação óssea e da atividade osteoclástica no osso alveolar provocam aumento na severidade das reabsorções radiculares (ENGSTRÖM; GRANSTRÖM; THILANDER, 1988; TENG; LIOU, 2014), o que foi coincidente neste estudo.

A ação do ozônio com forças mais leves, que não induzem à reabsorção radicular, deve ser testada para que possa ser avaliado se a aplicação da ozonioterapia em baixa concentração e com uma força ideal causará ou não reabsorção radicular.

5.3 CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS

Os resultados da terapia com ozônio frente a um estímulo inflamatório induzido foram bastante interessantes. O maior número de células durante o período avaliado proporcionou um resultado histológico positivo ao se pensar em movimentação dentária induzida.

Por ser a ortodontia uma ciência que trabalha com a osteorremodelação (reabsorção e neoformação óssea), observamos que no grupo 2 tratado com ozônio, esse processo se mostrou aumentado ao apresentar um maior número de osteoclastos no lado de pressão e maior número de osteoblastos no lado de tensão. Também a ausência de áreas hialinas nos grupos 2 e 3 onde foi realizada a ozonioterapia foi um achado muito interessante, pois essas áreas de ausência de células atrasam a movimentação dentária. O aumento da microcirculação local talvez tenha proporcionado todos estes fatores positivos para a movimentação ortodôntica.

O aumento indesejado das reabsorções dentárias provavelmente seja explicado pela alta taxa de inflamação da região. Sabe-se que a força ideal para a movimentação ortodôntica é uma força leve e constante (PROFFIT; FIELDS JR, 2000). Por isso, novas pesquisas deverão ser realizadas com forças leves, em modelos animais, para que se possa avaliar e quantificar o real benefício da ozonioterapia na movimentação ortodôntica. Para isto, sugere-se concentrações bioestimuladoras, que pareceu ser mais favorável para esta função. A concentração de 25 µg/ml obteve ótimos resultados na cicatrização da disjunção maxilar de ratos (BUYUK; RAMOGLU; SONMEZ, 2015), e também deveria ser testada frente a movimentação ortodôntica.

Também são sugeridas pesquisas na parte de estabilidade de tratamento utilizando a Ozonioterapia na concentração de 60 µg/ml, já que o resultado para esta concentração apresentou uma reorganização mais eficiente do tecido conjuntivo e finalização da atividade inflamatória em menor período de tempo.

Um maior tempo de movimentação induzida também deve ser avaliado em trabalhos futuros.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A terapia com ozônio aumentou o número de osteoclastos no lado de pressão e osteoblastos no lado de tensão, na concentração de 10 µg/ml, durante o período avaliado, demonstrando parâmetros histológicos favoráveis à osteorremodelação. Na concentração de 60 µg/ml, acelerou o processo de reorganização do ligamento periodontal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AJAMIEH, H. et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia–reperfusion. **Liver Int**, v.24, n.1, p.55-62, 2004.
- ALKAN, Ö. et al. Effects of Ozone and Prophylactic Antimicrobial Applications on Shear Bond Strength of Orthodontic Brackets. **Turk J Orthod**, v.30, n.4, p.101-5, 2017.
- ARSALANE, K. et al. Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.13, n.1, p.60-8, 1995.
- AZARPAZHOOH, A. et al. Evaluating the effect of an ozone delivery system on the reversal of dentin hypersensitivity: a randomized, double-blinded clinical trial. **J Endod**, v.35, n.1, p.1-9, 2009.
- BOCCI, V. **Ozone A new medical drug**. New York City: Springer; 2005.
- BOCCI, V. et al. Mechanisms of action and chemical-biological interactions between ozone and body compartments: a critical appraisal of the different administration routes. **Curr Drug Ther**, v.4, n.3, p.159-73, 2009.
- BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Med Gas Res**, v.1, n.1, p.6, 2011.
- BOCCI, V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Arch Med Res**, v.37, n.4, p.425-35, 2006.
- 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**, v.38, n.3, p.281-5, 2015.
- CANNING, B.J. et al. Ozone reduces murine alveolar and peritoneal macrophage phagocytosis: the role of prostanoids. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.261, n.4, p.L277-L82, 1991.
- CONSOLARO, A. Analgésicos e antiinflamatórios na movimentação dentária induzida: metodologia e interpretação. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial**, v.12, n.3, p.19-23, 2007.
- CONSOLARO, A. et al. Indirect bone resorption in orthodontic movement: when does periodontal reorganization begin and how does it occur? **Dental Press J Orthod**, v.16, n.3, p.25-31, 2011.
- COSOLA, S. et al. A short-term study of the effects of ozone irrigation in an orthodontic population with fixed appliances. **Eur J Paed Dent**, v.20, n.1, p.15-8, 2019.
- CRUZ GUERRA, O. et al. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. **Rev Cubana Estomatol**, v.34, n.1, p.21-4, 1997.
- ENGSTRÖM, C.; GRANSTRÖM, G.; THILANDER, B. Effect of orthodontic force on periodontal tissue metabolism a histologic and biochemical study in normal and hypocalcemic young rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.93, n.6, p.486-95, 1988.
- FONSECA, P.D.A. et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy at 940 nm on inflammatory root resorption in rats. **Lasers Med Sci**, v.28, n.1, p.49-55, 2013.
- FRACALOSSO, A.C.C. et al. Experimental tooth movement in murines: study period and direction of microscopic sections. **Dental Press J Orthod**, v.14, n.1, p.143-57, 2009.
- GÜLEÇ, A. et al. Effects of local platelet-rich plasma injection on the rate of orthodontic tooth movement in a rat model: A histomorphometric study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.151, n.1, p.92-104, 2017.
- HELLER, I.J.; NANDA, R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement: an experimental study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.75, n.3, p.239-58, 1979.
- HOFFMANN, S. et al. Influence of piezotomy and osteoperforation of the alveolar process on the rate of orthodontic tooth movement: a systematic review. **J Orofac Orthop**, v.78, n.4, p.301-11, 2017.
- ISCO3. **Madrid Declaration on Ozone Therapy**. 2nd. ed. Madrid: International Scientific Committee of Ozone Therapy; 2015.
- KATCHOOI, M. et al. Effect of supplemental vibration on orthodontic treatment with aligners: a randomized trial. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.153, n.3, p.336-46, 2018.
-
-

- KUMAR, A. et al. Current interpretations and scientific rationale of the ozone usage in dentistry: A systematic review of literature. **Eur J Gen Dent**, v.3, n.3, p.175-80, 2014.
- LONG, H. et al. Interventions for accelerating orthodontic tooth movement: a systematic review. **Angle Orthod**, v.83, n.1, p.164-71, 2012.
- LUO, J.-D.; CHEN, A.F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacol Sin**, v.26, n.3, p.259-64, 2005.
- MAGALHAES, F.N. et al. Ozone therapy as a treatment for low back pain secondary to herniated disc: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Pain Physician**, v.15, n.2, p.E115-29, 2012.
- MURPHY, K. et al. Percutaneous treatment of herniated lumbar discs with ozone: investigation of the mechanisms of action. **J Vasc Interv Radiol**, v.27, n.8, p.1242-50. e3, 2016.
- NOGALES, A.; MARTINEZ-SOBRIDO, L. Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines. **Int J Mol Sci**, v.18, n.1, p.20, 2017.
- NOGALES, C.G. et al. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological - ex vivo study and cytotoxicity analyses. **J Appl Oral Sci**, v.24, n.6, p.607-13, 2016.
- PATTERSON, B.M. et al. Corticotomies and orthodontic tooth movement: a systematic review. **J Oral Maxillofac Surg**, v.74, n.3, p.453-73, 2016.
- PATTERSON, B.M. et al. Effect of piezocision on root resorption associated with orthodontic force: A microcomputed tomography study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.151, n.1, p.53-62, 2017.
- PAULESU, L.; LUZZI, E.; BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 2. Induction of tumor necrosis factor (TNF-alpha) on human leucocytes. **Lymphokine Cytokine Res**, v.10, n.5, p.409-12, 1991.
- PROFFIT, W.R.; FIELDS JR, H.W. **Contemporary Orthodontics**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- RODRIGUES, R.C.D.S. **Ozonioterapia em paciente com osteonecrose mandibular: relato de caso**. Brasília: Universidade de Brasília; 2016.
- STÜBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. **Quintessence Int**, v.37, n.5, p.353-9, 2006.
- SUGIMORI, T. et al. Micro-osteoperforations accelerate orthodontic tooth movement by stimulating periodontal ligament cell cycles. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.154, n.6, p.788-96, 2018.
- TENG, G.Y.; LIOU, E.J. Interdental osteotomies induce regional acceleratory phenomenon and accelerate orthodontic tooth movement. **J Oral Maxillofac Surg**, v.72, n.1, p.19-29, 2014.
- TIWARI, S. et al. Dental applications of ozone therapy: A review of literature. **Saudi J Dent Res**, v.8, n.1-2, p.105-11, 2017.
- TORRI, S.; WEBER, J.B.B. Influence of low-level laser therapy on the rate of orthodontic movement: a literature review. **Photomed Laser Surg**, v.31, n.9, p.411-21, 2013.
-