

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

GUILHERME PIVATTO LOUZADA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA SOBRE A  
REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS, COM XENOENXERTO  
BOVINO, EM RATOS SUBMETIDOS À CORTICOTERAPIA**

Porto Alegre  
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

~ 2 ~

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

GUILHERME PIVATTO LOUZADA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA SOBRE A REGENERAÇÃO DE DEFEITOS  
ÓSSEOS CRÍTICOS, COM XENOENXERTO BOVINO, EM RATOS SUBMETIDOS À CORTICOTERAPIA**

PORTO ALEGRE

2017

GUILHERME PIVATTO LOUZADA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA SOBRE A REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS, COM XENOENXERTO BOVINO, EM RATOS SUBMETIDOS À CORTICOTERAPIA**

*Linha de pesquisa: Diagnóstico e Terapêutica Aplicadas*

Dissertação apresentado como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de CTBMF, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Martha Campos

PORTO ALEGRE

2017

## Ficha Catalográfica

L895 LOUZADA, GUILHERME PIVATTO

Avaliação dos efeitos da ozônio terapia sistêmica sobre a regeneração de defeitos ósseos críticos, com xenoenxerto bovino, em ratos submetidos à corticoterapia / GUILHERME PIVATTO LOUZADA . – 2017.

72 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos.

1. Regeneração óssea. 2. Osteoporose. 3. Enxerto ósseo. 4. Ozônio terapia. 5. Glicocorticóides. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

GUILHERME PIVATTO LOUZADA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA SOBRE A REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS, COM XENOENXERTO BOVINO, EM RATOS SUBMETIDOS À CORTICOTERAPIA**

Dissertação apresentado como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de CTBMF, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira

---

Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

---

Prof.

PORTO ALEGRE

2017

## **Dedicatória**

À minha família que representa meu alicerce.

Aos meus pais José Luiz Z. Louzada Junior e Ester Luza Pivatto Louzada, que me apoiaram de forma incansável, incentivando meu crescimento profissional, são meu esteio.

À minha namorada, que sempre me deu todo o seu amor e carinho, impulsionando minha determinação, resgatando minhas forças. Aos meus avós, que tanto rezam pela minha saúde e felicidade.

Ao Prof.Dr. Cláiton Heitz, que me apoiou, incentivou, ensinou, orientando durante minha trajetória, não me deixou cair em nenhum momento, me confortando e mostrando o caminho nas horas mais difíceis.

Ao meu irmão, que é meu motivo de alegria e de grande inspiração à busca do conhecimento para deixar um exemplo a seguir.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço profundamente a todos que contribuíram e que participam de minha construção pessoal, profissional e espiritual. Sou afortunado por tê-los junto a mim e no horizonte da vida.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que através de toda a estrutura excelente e qualidade de ensino, me proporcionaram condições ideais à plena formação e oportunidades de desenvolvimento intelectual. Trilhei todos os caminhos possíveis nessa instituição e seguirei entusiasta desta filosofia.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, pelas oportunidades de ensino durante o curso de Mestrado.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia da PUCRS Prof. Dr. Alexandre Bahlis, por sua dedicação e profissionalismo, me ensinando e norteando em minhas decisões durante os momentos mais difíceis da minha formação.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Martha Campos que diante de tantas adversidades encontradas ao longo desta caminhada, se mostrou uma pessoa fundamental durante a minha formação, com certeza a partir dos ensinamentos prestados, me possibilitou o meu crescimento, em todos os aspectos, mas principalmente do lado humano, me fazendo refletir inúmeras vezes em relação aos caminhos que estava seguindo, e que de uma forma geral, se tornou indispensável para me nortear no caminho do sucesso.

Ao Prof. Dr Claiton Heitz, por ser uma pessoa indispensável durante toda a minha formação acadêmica, seguindo de exemplo maior e como fonte de inspiração. Certamente é nesta figura que busco me aproximar não apenas do ponto de vista profissional, já que és consagrado na área de atuação da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, mas sim pelo carisma e bom coração.

Ao Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS, pela utilização das dependências para a realização dos experimentos com animais.

Ao Laboratório de Patologia da PUCRS, por possibilitar a realização das análises histológicas e utilização de toda a infraestrutura do laboratório.

À CAPES, pelo apoio financeiro disponibilizado através da bolsa de Mestrado, indispensável para a execução deste curso.

À Janaina P. Nunes do laboratório de Patologia da PUCRS, responsável pelo processamento das amostras e ajuda na confecção das lâminas.

Aos meus pais, por serem a base de toda a minha existência, devo tudo que sou aos esforços que me proporcionaram para o meu desenvolvimento, e ofereço as minhas conquistas como parte dos agradecimentos pela minha criação. Amo vocês!

Ao meu Pai, que é o homem da minha vida, é nele que busco me espelhar e seguir como exemplo em todas as minhas decisões. Se um dia puder ser parecido com o que ele é, já me considerarei um vencedor.

À minha querida mãe, por vivenciar cada etapa da minha formação, com sacrifício, sendo minha fiel escudeira, me protegendo de todas as situações, me confortando com um abraço de amor, e sendo esta pessoa única em minha vida.

A minha namorada Rubiana F. Gossler, que esteve ao meu lado em todos os momentos, principalmente dos mais difíceis, me fortalecendo e me dando confiança para seguir em frente sempre. E a sua família, que também considero parte de mim, sendo pessoas especiais e me ajudando com amor e carinho.

Ao Matheus da Silva Nunes, que com uma convivência agradável, amizade e profissionalismo, colaborou durante todos os experimentos executados, crescendo junto comigo durante cada fase nova de descobertas.

Ao Fabio Rahmeier, por ter sido colaborador durante a pesquisa, cedendo os equipamentos geradores de ozônio bem como o laboratório da empresa OZ Engenharia, viabilizando a realização deste trabalho.

Aos colegas do Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS, que estiveram presente compartilhando seus conhecimentos durante esta caminhada.

Familiares, Amigos, Professores, Colegas, Alunos, Demais Colaboradores o meu Muito Obrigado!



## RESUMO

Objetivo: O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da ozonioterapia sistêmica sobre o remodelamento ósseo de defeitos críticos na calota de ratos, com e sem a presença de xenoenxerto, utilizando um modelo animal de imunossupressão induzido por corticoterapia. Métodos: Foram utilizados 64 ratos machos Wistar (180-220 g), distribuídos em 8 grupos experimentais (N = 8/grupo). Para a corticoterapia (grupos II, IV, VI e VIII), os animais receberam dexametasona (1 mg/kg; i.p.), uma injeção a cada 48 h, com início duas semanas antes dos procedimentos cirúrgicos, se estendendo até a eutanásia. Os animais controles (grupos I, III, V e VII) receberam solução salina (10 ml/kg; i.p.), nos mesmos intervalos de tempo. Após duas semanas do início da corticoterapia, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (100 e 10 mg/kg; i.p.), para a confecção de dois defeitos críticos nos ossos parietais da calota craniana (5 mm de diâmetro). Os defeitos foram preenchidos com coágulo (grupos I, II, V e VI) ou com xenoenxerto Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials, Germany) (grupos III, IV, VII e VIII). Em todos os grupos, o defeito da direita foi coberto por uma membrana de colágeno Bio-Gide® (Geistlich Biomaterials, Germany). Para a ozonioterapia sistêmica, os animais dos grupos V, VI, VII e VIII receberam uma aplicação de ozônio (0,7 mg/kg; i.p.), todos os dias, durante 7 dias, iniciando imediatamente após a cirurgia. Decorridos quatro semanas da criação dos defeitos, os animais foram eutanasiados e as calotas cranianas foram coletadas para avaliação histológica da neoformação óssea, com coloração de hematoxilina e eosina (HE). Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (7691). Foram realizadas análises histológicas qualitativas baseado no aspecto do trabeculado ósseo, atividade osteoblástica em torno da matriz óssea, padrão de formação de tecido conjuntivo na área do defeito, e existência de partículas de enxerto na região. Resultados: Os grupos V, VII apresentaram maiores áreas ósseas ao longo da superfície do defeito, em comparação com os VI e VIII, como consequência dos efeitos potenciais do ozônio no remodelamento ósseo, minimizando as interferências negativas na microarquitetura óssea causada pelos glicocorticóides. A presença do xenoenxerto nos grupos III, IV, VII, VIII, proporcionou o recobrimento de extensa área do defeito, formando matriz óssea imatura mais proeminente nas proximidades dos bordos dos defeitos, com presença de partículas de enxerto dispersas na área central. A presença da membrana de colágeno tipo I, se mostrou um importante recurso na aceleração do remodelamento ósseo utilizado em todos os grupos experimentais, na qual em comparação com os defeitos contralaterais em que não foi utilizado a membrana, pode ser visto um significativo aumento de osso recém-formado. A nível sistêmico, os resultados do

tratamento com ozônio possibilitaram a diminuição de efeitos adversos dos glicocorticoides, tais como a diminuição do peso corporal dos animais e atrofia de órgãos linfáticos como o baço, observados nos grupos tratados isoladamente com a dexametasona. Conclusão: Diante das limitações do estudo animal, a utilização de ozônio sistêmico associado ao xenoenxerto, estimula o remodelamento ósseo em defeitos críticos de ratos imunossuprimidos.

**DESCRITORES<sup>1</sup>**

Ozônio, glicocorticóides, osteoporose, imunossupressão, regeneração óssea.

<sup>1</sup>DeCS- Descritores em Ciências da Saúde, disponível em <http://decs.bvs.br>

## ABSTRACT

Objective: The present study aimed to evaluate the effects of systemic ozonotherapy on bone remodeling of critical defects in the calotte of rats, with and without a xenograft presence, using an animal model of immunosuppression induced by corticosteroids. Methods: Sixty male Wistar rats (180-220 g), distributed in 8 experimental groups (N = 8 / group) were used. For corticosteroid therapy (groups II, IV, VI and VIII), the animals received dexamethasone (1 mg / kg; i.p.), one injection every 48 h, starting two weeks before the surgical procedures, extending to euthanasia. Control animals (groups I, III, V and VII) received saline solution (10 ml / kg, i.p.) at the same time intervals. After two weeks of corticosteroid therapy, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (100 and 10 mg / kg, i.p.) to produce two critical defects in the parietal bones of the skull cap (5 mm diameter). The defects were filled with clot (groups I, II, V and VI) or Bio-Oss x xenograft (Geistlich Biomaterials, Germany) (groups III, IV, VII and VIII). In all groups, the right defect was covered by a Bio-Gide® collagen membrane (Geistlich Biomaterials, Germany). For systemic ozono-therapy, animals of groups V, VI, VII and VIII received an application of ozone (0.7 mg / kg, i.p.) every day for 7 days, starting immediately after surgery. Four weeks after the defects were created, the animals were euthanized, and the skull caps were collected for histological evaluation of the bone neoformation with hematoxylin and eosin (HE) staining. The protocols were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (7691). Qualitative histological analyzes were performed based on the pattern of connective tissue formation around the defect, existence of inflammatory cells in the region, aspect of bone trabeculated, osteoblastic activity around the bone matrix and existence of graft particles in the region. Results: Groups V and VII presented greater bone areas along the surface of the defect compared to VI and VIII, because of the potential effects of ozone on bone remodeling, minimizing negative interference in the glucocorticoid bone microarray. The presence of the xenografts groups III, IV, VII, VIII, provided the covering of an extensive area of the defect, forming a more prominent immature bone matrix near the edges of the defects, with the presence of graft particles dispersed in the central area. The presence of the type I collagen membrane was shown to be an important tool in the acceleration of bone remodeling used in all experimental groups, in which, in comparison to contralateral defects in which the membrane was not used, a significant increase of bone just graduated. At the systemic level, the results of ozone treatment allowed the reduction of adverse effects of glucocorticoids, such as the reduction of the body weight of the animals and atrophy of lymphatic organs such as spleen, observed in the groups treated alone with dexamethasone.

Conclusion: Given the limitations of the animal study, the use of systemic ozone associated with the xenograft stimulates bone remodeling in critical defects of immunosuppressed rats.

**DESCRIPTORS<sup>2</sup>**

Ozone, xenograft, bone regeneration, osteoporosis, immunosuppression

<sup>2</sup>MeSH- Medical Subject Headings, available at: [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh)

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

Glicocorticóides- GC

Ozônio-OZ

Osteoporose-OP

Dexametasona-DEX

Dual-energy X-ray Absorptiometry Scan-DXA

Densidade mineral óssea- DMO

Proteína morfogenética óssea-BMP

Interleucina-IL

Fator de necrose tumoral-TNF- $\alpha$

Fator  $\beta$  transformador de crescimento-TGF- $\beta$

Fator de crescimento semelhante a insulina-IGF

Membrana de colágeno tipo I- MC

Osteoblasto- OB

Osteoclastos- OC

Ativador nuclear Kappa-b- RANK

Ligante do ativador nuclear Kappa-b- RANKL

Osteoprotegerina- OPG

Hidroxiapatitas- HA

$\beta$ -tricálcio-fosfato-  $\beta$ -TCP

Politetrafluoretileno expandido- e-PTFE

Ácido poliglicólico- PGA

Ácido poli-láctico- PLA

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<i>Metabolismo ósseo</i> .....	18
<i>Osteoporose</i> .....	22
<i>Enxertos ósseos</i> .....	23
<i>Usos terapêuticos do ozônio</i> .....	26
<b>OBJETIVOS</b> .....	28
<i>Objetivo geral</i> .....	28
<i>Objetivos específicos</i> .....	28
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<i>Animais</i> .....	29
<i>Desenho experimental e cálculo amostral</i> .....	29
<i>Criação dos defeitos críticos</i> .....	31
<i>Indução de imunossupressão</i> .....	30
<i>Terapia com ozônio</i> .....	31
<i>Calibração do gerador de ozônio</i> .....	32
<i>Eutanásia e coleta de amostras</i> .....	33
<i>Análise histológica</i> .....	33
<i>Análise estatística</i> .....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43
<b>LISTA DE FIGURAS E LEGENDAS</b> .....	52
<i>ANEXO A- Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS</i> .....	66
<i>ANEXO B- Carta de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais -PUCRS</i> .....	67
<i>ANEXO C- Comprovante de trabalho científico publicado</i> .....	68



## INTRODUÇÃO

O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da terapia com ozônio sobre o metabolismo ósseo e, determinar a sua influência na otimização dos processos de remodelamento ósseo em xenoenxertos, utilizando um modelo animal de imunossupressão induzido por corticoterapia.

A reconstrução de defeitos ósseos extensos representa um grande desafio na área da cirurgia bucomaxilofacial (KAN *et al.*, 2015). Muitos materiais para enxertia óssea são desenvolvidos, com a finalidade de auxiliar nos processos de regeneração e, no tratamento global em cada caso. O objetivo dos enxertos é facilitar o crescimento de osso novo em áreas extensas de reabsorção alveolar (KAZANCIOGLU *et al.*, 2006). O osso autógeno, devido a sua característica osteogênica, através das propriedades de osteoindução e osteocondução, tornou-se o padrão ouro para a enxertia. No entanto, devido à limitação de fornecimento, o tempo cirúrgico adicional e o risco de morbidade, tornam suas indicações bastante limitadas (JENSEN *et al.*, 2006). O xenoenxerto, que é derivado de um doador de espécie diferente e, aceito como um material osteocondutor, atua como uma estrutura de suporte para a formação do novo osso, disponibilizando quantidades suficientes para a reconstrução dos defeitos, sem causar morbidade em outro sítio do próprio paciente (KOHAL *et al.*, 2015). Em busca da otimização da cicatrização óssea, terapias adjuntas de reconstrução dos defeitos são utilizadas como alternativas, dentre as quais destacam-se as terapias farmacológicas, bem como, as abordagens terapêuticas, incluindo o uso de oxigenoterapia hiperbárica, laserterapia de baixa potência e, mais recentemente, da ozonioterapia (OZDEMIR *et al.*, 2013).

O ozônio (O<sub>3</sub>) está normalmente disponível na forma gasosa e surge da combinação de três átomos de oxigênio com uma estrutura cíclica (BOCCI *et al.*, 2006). É objeto de estudo na Odontologia durante a última década, por causa de sua atividade antimicrobiana e eficácia no tratamento de doenças orais (ALPAN *et al.*, 2016). Seus efeitos podem influenciar positivamente o metabolismo do oxigênio, o sistema de defesas antioxidantes e, a microcirculação dos tecidos, reagindo com componentes do sistema vascular, como células endoteliais, leucócitos, plaquetas e eritrócitos (KAZANCIOGLU *et al.*, 2006; OZDEMIR *et al.*, 2013). Os efeitos sobre a cicatrização óssea foram descritos por Kazancioglu e colaboradores (2006), que descreveram uma melhora do processo de remodelamento ósseo, com aumento da atividade osteoblástica, na cicatrização de enxertos ósseos em ratos diabéticos.

Fármacos como os glicocorticoides (GC), que possuem potente ação anti-inflamatória e imunossupressora, são amplamente utilizados por muitas décadas na prática médica, no tratamento de uma variedade de doenças autoimunes, distúrbios sistêmicos adquiridos, desordens congênitas, pós-operatório cirúrgico e, em pacientes transplantados (RIZZOLI et al., 2012; KIM *et al.*, 2010; KOUNTZ *et al.*, 1997). Os corticoides atuam em várias etapas da resposta inflamatória, reduzindo a proliferação de células T e de citocinas (WEINSTEIN, 2001). As altas doses associado a longos períodos de terapia, para o tratamento de determinadas doenças, pode acarretar efeitos colaterais relevantes, como diabetes, obesidade, perda de massa óssea, alterações nos níveis de hemoglobina e hemácias circulantes, dificuldades de cicatrização, além da imunodepressão, devido à inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (WEINSTEIN, 2001). No metabolismo ósseo, o uso sistêmico prolongado de glicocorticoides pode desencadear graves alterações no processo fisiológico de remodelamento ósseo, levando a uma deterioração da microarquitetura através da diminuição na densidade mineral óssea que conseqüentemente aumenta a possibilidade de fraturas e o desenvolvimento da osteoporose secundária por medicação (HSU e NANES, 2017). Os corticoides são considerados a terceira causa mais frequente de osteoporose secundária (GOVINDARAJAN et al., 2013). O efeito direto no osso é dose e tempo dependente, aumentando o risco relativo de fraturas já nas fases iniciais da terapia (HSU e NANES, 2017; MAZZIOTTI et al., 2016). Os mecanismos da inibição de osteócitos e da diferenciação de osteoblastos, podem ser explicados através das interferências na via de sinalização canônica de Wnt/  $\beta$ -catenina, que é uma via de regulação chave da osteoblastogênese (GOVINDARAJAN et al., 2013; CANALIS et al., 2007). Por outro lado, os glicocorticoides induzem a apoptose dos osteoblastos maduros, a partir da ativação da caspase-3, responsável pelas vias de sinalização pró-apoptóticas. Estes processos provocam a redução da neoformação óssea (CANALIS et al., 2007). Ademais, o comprometimento da atividade de reabsorção dos osteoclastos, por interferência na sua estrutura e na distribuição dos microtúbulos do citoesqueleto, acaba por interferir no equilíbrio do remodelamento ósseo (RANG *et al.*, 2012).

### *Metabolismo ósseo*

O tecido ósseo é descrito como um tecido conjuntivo especializado, sendo sua principal característica a mineralização da matriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). É composto por uma matriz orgânica, que corresponde a 33% de seu volume total e, por elementos inorgânicos como os íons e cristais de hidroxapatita que correspondem a 67% (ROSS e PAWLINA, 2012). A porção

inorgânica da matriz óssea, é chamada também de parte mineral óssea, na qual os principais íons encontrados são o fosfato e o cálcio, mas há, também, a presença de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades (CORMACK, 2003). Junqueira, por sua vez, afirma que a parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. O cálcio e o fósforo formam cristais de hidroxiapatita, cuja fórmula é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , no tecido ósseo (BOSKEY, 2013). O cálcio, que fica armazenado no tecido ósseo, pode ser mobilizado e captado pelo sangue para manter os níveis apropriados em todos os tecidos do corpo (CORMACK, 2003; BOURNE, 1972). Devido ao constante processo de formação e reabsorção óssea, é possível haver a reparação tecidual e a homeostasia mineral do corpo através da manutenção dos íons cálcio, fósforo e magnésio (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). A associação da hidroxiapatita com as fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Caso haja uma perda significativa de cálcio, os ossos mantêm sua forma intacta, porém se tornam tão flexíveis quanto os tendões (CORMACK, 2003). Caso a perda seja de tecido orgânico, especialmente de colágeno, o osso também permanece com sua forma intacta, todavia torna-se extremamente quebradiço (ROSS e PAWLINA, 2012). O principal constituinte da matriz óssea orgânica é o colágeno tipo I, seguido do tipo V. Além deste, são encontradas outras proteínas responsáveis pela mineralização da matriz como as proteoglicanas, glicoproteínas, proteína morfogenética óssea (BMP). As citocinas do tipo interleucina-1 (IL-1), e interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator  $\beta$  transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), além de hormônios e enzimas importantes ao metabolismo ósseo, também são encontrados (BOSKEY, 2013; FONSECA, 2013).

No tecido ósseo, quatro elementos celulares distintos são encontrados: as células de revestimento ósseo, ou células osteoprogenitoras, que podem permanecer em repouso ou entrar em atividade para produzir osso; os osteoblastos, responsáveis pela formação; os osteócitos, os quais têm a função de manutenção do tecido; e os osteoclastos, capazes de reabsorver o osso (CORMACK, 2003; BOURNE, 1972). Os osteoblastos (OB) são células diferenciadas, originadas a partir de células osteoprogenitoras da medula óssea, responsáveis por manter a viabilidade do tecido ósseo, com a função de neoformação, através da síntese de matriz óssea não mineralizada (DOWNEY e SIEGEL, 2006). Elas são as responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos, colágeno do tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas, bem como, dos componentes inorgânicos. Realizam a formação e armazenamento de diversas proteínas, como a osteocalcina, a osteopontina e sialoproteínas ósseas, que iniciam o processo de remineralização, através de

receptores celulares de superfícies que se ligam a diversas proteínas extracelulares da matriz, fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Portanto as células osteoblásticas desempenham um importante papel na síntese de tecido ósseo (BOYCE *et al.*, 2012). Os osteoblastos influenciam na sinalização para a reabsorção óssea através da síntese de proteínas como o M-CSF e RANKL, que são essenciais na produção de osteoclastos (CHARLES e ALIPRANTIS, 2014). São células encontradas na superfície de ossos em formação, constituindo uma espécie de epitélio (ROSS e PAWLINA, 2012). Apresenta citoplasma basofílico e núcleo excêntrico, distal em relação à superfície do osso. A atividade de síntese pode ser medida pela morfologia destas células: durante a produção de matriz, elas têm citoplasma basofílico e um formato cuboidal em colunas; quando a atividade de síntese diminui, elas se tornam planas e a basofilia citoplasmática diminui (CORMACK, 2003). Estes processos citoplasmáticos se tornam mais evidentes quando essas células se envolvem na matriz sintetizada nova. Quando isto ocorre, estas células são chamadas de osteócitos. A cavidade onde elas se encontram é chamada de lacuna e o espaço ocupado pelas extensões citoplasmáticas é chamado canalículo (ROSS e PAWLINA, 2012). A matriz nova que é depositada na superfície de ossos mais velhos é chamada osteoide e, fica entre a superfície do osso mais velho e a camada de osteoblastos. Esta nova matriz não é calcificada ainda e a aposição de osso é completada quando os sais de cálcio são depositados. Os osteócitos são células maduras, plenamente diferenciadas da linhagem osteoblástica, que se tornaram inclusas na matriz e realizam a sua manutenção (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). Elas residem em pequenos espaços ou lacunas dentro do osso. Essas lacunas estão conectadas umas às outras e aos espaços vasculares por canalículos, pequenos canais dentro dos quais processos citoplasmáticos dos osteócitos se projetam. Através dos canalículos, passam fluidos relacionados ao metabolismo celular (ROSS e PAWLINA, 2012).

Os osteoclastos (OC) são células gigantes multinucleares cujos citoplasmas contêm diversas mitocôndrias. Estas células realizam a reabsorção óssea e podem ser vistas em pequenos grupos ou, isoladamente, em superfícies que estão sendo reabsorvidas. Elas são geralmente encontradas em cavidades na superfície do osso (lacunas de Howship). É sugerido que um osteoclasto pode remover o que é depositado por 100 a 1000 osteoblastos (ROSS e PAWLINA, 2012; CORMACK, 2003). A ausência de atividade osteoclástica, ocorrida após a maturidade esquelética, também pode estar associada ao enfraquecimento ósseo e ao aumento do risco de fratura (Heaney *et al.*, 2003). A diferenciação e maturação dos osteoclastos são mediadas por citocinas e fatores de crescimento, dentre os quais destacam-se IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, TNF, fator estimulador de colônia

granulocítica-macrofágica (FSC-GM) e fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF). Os mediadores RANK, RANKL e osteoprotegerina (OPG), associados a células progenitoras e osteoblastos, são os grandes fatores responsáveis na osteoclastogênese. O RANK é um receptor transmembrana da família do TNF que está presente em células precursoras de osteoclastos, fibroblastos, células T, células dendríticas e osteoclastos maduros. A ativação do RANK pelo RANKL é um importante mecanismo que promove a maturação dos osteoclastos pelo aumento da expressão de genes específicos. A principal função do RANKL é a inibição de apoptose dos osteoclastos, bem como, a ativação e diferenciação destas células, que resulta em aumento dos osteoclastos ativos e, por consequência, na reabsorção óssea (KHOSLA, 2001). A estimulação das células induzidas por M-CSF pelo RANKL provoca a diferenciação em osteoclastos funcionais que, após aderir na matriz óssea, irá promover um ambiente ácido capaz de desmineralizar e solubilizar os componentes orgânicos e inorgânicos. Este processo é mediado por enzimas proteolíticas secretadas pelos osteoclastos como a catepsina K e adenosina trifosfatase (CHARLES e ALIPRANTIS,2014). A OPG é um receptor insolúvel que atua como antagonista do RANKL, sendo um receptor inibidor do RANKL, através do bloqueio da interação RANK/RANKL por meio da ligação com RANK e também diretamente, por meio de outros receptores presentes nos osteoclastos (KHOSLA, 2001). Tanto a OPG quanto o RANKL são regulados por vários hormônios; dentre eles, podemos destacar os glicocorticoides, vitamina D, estrógenos, além de citocinas. Estes compostos, influenciam a diferenciação de osteoclastos por meio da regulação da produção de RANKL/ OPG pelas células estromais e pelos osteoblastos (STEEVE *et al.*, 2004).

O mecanismo de remodelação óssea é um fenômeno continuado, sendo fundamental para a renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade. Nele, a reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos constantes, de maneira dependente, realizados pelas células do tecido ósseo; o desequilíbrio desta relação pode acarretar em ganhos ou perdas de massa óssea (SHIEH *et al.*, 2016). A maior atividade osteoclástica através de aumento no processo de reabsorção óssea pode aumentar os riscos de fratura, uma vez que proporciona a formação de osso mais frágil, assim como em outras doenças ósseas tais como osteoporose, hiperparatireoidismo, doença de Paget e doença óssea metastática (CUMMINGS *et al.*, 2002). É importante entender a relação dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Dentre os marcadores de formação óssea que representam a atividade dos osteoblastos, cabe destacar a fosfatase alcalina e a osteocalcina. Por outro lado, dentre os marcadores bioquímicos de reabsorção óssea que estão relacionados aos

osteoclastos, destacam-se a hidroxiprolina, interligadores do colágeno e a fosfatase ácida tartarato-resistentes (KHOSLA, 2001).

### *Osteoporose*

A osteoporose (OP) é uma doença osteometabólica de perda da microarquitetura óssea através da redução da quantidade e qualidade óssea, que vem a causar fragilidade acentuada da estrutura esquelética, predispondo a um maior risco de fraturas (DOWNEY e SIEGEL, 2006, CHAVASSIEUX et al., 2000). De acordo com a Fundação Internacional de Osteoporose (IOF) os dados recentes apontam que a doença atinge mais de duzentos milhões de mulheres, sendo que um em cada três mulheres após os 50 anos podem sofrer com fraturas osteoporóticas, subindo este percentual de acordo com o avançar da idade. A prevalência tem demonstrado números cada vez maiores em função do crescimento da população idosa e das mudanças no comportamento humano, como a diminuição de atividades físicas, baixa exposição solar, alterações em hábitos alimentares, com baixa ingestão de cálcio e vitamina D, baixa exposição ao sol, alcoolismo e tabagismo (WANNMACHER, 2004). A osteoporose pode ser classificada em primária como consequência de um desequilíbrio hormonal do processo natural da menopausa ou envelhecimento e a secundária quando resulta de outra causa como doença inflamatória, alteração metabólica ou utilização de medicações que resultam em perda óssea como é o caso dos glicocorticóides (SOUSA et al., 2017). A osteoporose primária está relacionada a uma diminuição nos níveis de estrógeno pós-menopausa e consequente maior atividade osteoclástica, que provoca uma perda de osso trabecular mais acentuado que o ritmo normal. A predisposição de fratura em ossos longos e vértebras são verificadas de acordo com a diminuição linear da densidade mineral óssea (DMO) (DOWNEY e SIEGEL, 2006). O método mais comumente usado e eficaz de diagnosticar a osteoporose é através do exame de Absorciometria por dupla emissão de raios X (Dual-energy X-ray Absorptiometry Scan- DXA) (HANSEN et al., 2014). A mensuração do conteúdo mineral ósseo corresponde à quantidade mineral dividida pela área óssea estudada. A região mais utilizada para mensuração da (DMO) é o colo do fêmur, ossos do punho e coluna vertebral, onde o diagnóstico é baseado em um T-score, calculado tendo como referência a densidade mineral óssea média do pico de massa óssea em jovens saudáveis (GOVINDARAJAN et al., 2013). Os glicocorticóides constituem a causa mais freqüente de osteoporose secundário, na qual o uso crônico prolongado por mais de seis meses é responsável por causar (OP) em metade dos usuários. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a ocorrência de osteoporose

devido à ação dos glicocorticóides, que podem ser expressos diretamente na formação e reabsorção óssea devido a interferências na supressão da atividade osteoblástica (DOWNEY e SIEGEL, 2006). Os efeitos indiretos são vistos através da diminuição da absorção intestinal e do aumento da excreção renal de cálcio, além da desregulação da secreção de hormônios sexuais, hormônio da paratireóide e hormônio do crescimento (CANALIS et al.,2007). A perda óssea tem um início mais acentuado em uma fase inicial durante os primeiros meses de uso contínuo, que tende a diminuir com o passar do tempo, se mantendo em uma faixa de 5% de perda óssea anual. A perda óssea acontece mais pronunciadamente em osso trabecular devido sua metabolização mais ativa, propiciando a ocorrência de fraturas osteoporóticas por glicocorticóides em 30 a 50% dos pacientes adultos (RIZZOLI et al., 2012). A osteoporose é uma doença silenciosa, desta forma é importante que haja um monitoramento constante de pacientes que se enquadram em um grupo de risco, com uso contínuo de glicocorticóides, uma vez que as fraturas associadas a esta doença constituem a grande complicação relacionada à doença, provocando sérios problemas de qualidade de vida do paciente (HANSEN et al.,2014, CANALIS et al.,2007).

#### *Enxertos ósseos*

A complexidade do tratamento cirúrgico para correção de extensos defeitos ósseos é um grande desafio para os cirurgiões bucomaxilofaciais. Existem diferentes tipos de enxertos ósseos utilizados em reconstruções de defeitos críticos, sendo que o osso autógeno, devido às suas características potenciais de regeneração, através das propriedades biológicas de osteocondução, osteoindução e osteogênese, é considerado o padrão ouro para enxertia (MAZOK *et al.*, 2004; LEMOS *et al.*, 2016; MIRON *et al.*, 2016). A osteogênese representa a capacidade que o material de enxerto possui de formar osso, sem depender das células do leito receptor, servindo de arcabouço para as células osteoprogenitoras, através dos próprios osteoblastos transplantados. Nesse caso, o material de enxerto ativa a neoformação no sítio ósseo, sendo um atributo exclusivo dos enxertos autógenos (PARK *et al.*, 2009). A osteoindução é a propriedade de formação de novo osso pelas células osteoprogenitoras do próprio leito receptor, sob a influência de um agente indutor do enxerto, através da transformação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e condroblastos (LINDHE *et al.*, 2005; MIRON e ZHANG, 2012). A osteocondução é a capacidade que o tecido ósseo tem de servir como matriz física ou arcabouço para o recrutamento de células mesenquimais diferenciadas, proporcionando a deposição e proliferação celular com atividade osteoblástica e, permitindo a neoformação óssea (MISH, 2000). Além disso, por ter

origem do próprio indivíduo, o enxerto autógeno favorece a aceitação do procedimento pelo organismo com menor risco de rejeição. Entretanto, devido às limitações de disponibilidade dos enxertos autógenos, bem como, maior morbidade, necessidade de internação, tempo cirúrgico aumentado e potenciais de infecções, vem crescendo a procura por alternativas que otimizem este déficit e permita a reabilitação do paciente (CLAVERO *et al.*, 2003; MAZOK, 2004).

Além do enxerto autógeno, pode-se encontrar outros biomateriais de enxerto que são classificados de acordo com a sua origem. Dentre estes podemos citar o osso alógeno, xenógeno e aloplástico. Os aloenxertos ou enxertos homogêneos são obtidos por membros de uma mesma espécie, porém de indivíduos diferentes, sendo disponibilizados através de bancos de ossos (BLOCKHUIS *et al.*, 2000). Os materiais aloplásticos são enxertos de origem sintética, de característica bioinerte, apresentando menor suscetibilidade de causar reações biológicas adversas, devido a sua estabilidade química e por serem bioativos. Seus efeitos são mediados por ligações de natureza química, estabelecidas entre o material e o tecido ósseo, participando de maneira ativa no processo de cicatrização e regeneração óssea (MURUGAN e HAMAKRISHNA, 2005). São utilizados na reconstrução de defeitos ósseos, de acordo com as propriedades de osteocondução, pela promoção de um arcabouço para a angiogênese e neoformação óssea. São exemplos desses materiais, as hidroxiapatitas (HA), o fosfato de cálcio, especialmente o  $\beta$ -tricálcio-fosfato ( $\beta$ -TCP), além dos biovidros e vitro-cerâmicas (MIRON *et al.*, 2016; BRUNET *et al.*, 2001; VALENTINI *et al.*, 2003).

Os xenoenxertos são substitutos ósseos provenientes de espécies diferentes, mais comumente originados de osso bovino (CARVALHO *et al.*, 2004; PIATELLI, 1999). São classificados como materiais inorgânicos devido a suas características físico-químicas, resultantes do processamento. São compostos predominantemente de colágeno tipo I e resíduos de fatores de crescimento, sendo que o material inorgânico é obtido a partir da desproteínização do osso, por meio de reações termoquímicas que removem a porção orgânica, restando, principalmente, grânulos de hidroxiapatita (HA) (CARVALHO *et al.*, 2004). Segundo Le Geros *et al.* (1991) e Kim *et al.* (2016), a estrutura da hidroxiapatita é similar entre as espécies; esse fator combinado à resistência biomecânica equivalente àquela do osso humano, além dos tratamentos intensivos de superfície para evitar respostas inflamatórias adversas, faz deste tipo de material um substituto satisfatório para a enxertia (MISH e DIETISH, 1993).

Outra alternativa como terapêutica complementar, que pode ser utilizada como técnica auxiliar em busca da otimização dos processos de cicatrização e regeneração óssea guiada (ROG),



se dá através da utilização de membranas, que servem como barreiras físicas seletivas para impedir a migração e crescimento de células epiteliais e conjuntivas no interior do defeito ósseo (NYMAN et al.,1982; ZELLIN e LINDE, 1997). Através desta propriedade seletiva, é possível promover o recrutamento de células osteogênicas, além de permitir a manutenção do espaço para que ocorra a neoformação óssea no tempo esperado. Segundo Buser et al. (2000), as membranas são frequentemente utilizadas para a estabilização de enxertos nos locais apropriados, sem que haja dispersão do material, limitando a sua taxa de reabsorção. Em geral, existem dois tipos de membranas disponíveis de acordo com as características de degradação, como as reabsorvíveis e as não reabsorvíveis. As membranas apresentam propriedades distintas umas das outras, que variam de acordo com a sua constituição, morfologia, textura de superfície, tempo de degradação e porosidade de superfície, que irão influenciar na regeneração óssea (ZELLIN e LINDE, 1997). As membranas não reabsorvíveis podem ser confeccionadas a base de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) e utilizadas com eficiência como barreiras seletivas em regenerações ósseas guiadas. Estas podem ser mantidas durante o tempo necessário de osteogênese, sem que haja interferências locais com o material. A desvantagem deste material é a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para a sua remoção, o que provoca maiores gastos financeiros, desconforto adicional e suscetibilidade de infecções (LEKOVIC et al.,1990; BECKER et al.,1994; VON ARX et al. 2001). As membranas reabsorvíveis, podem ser feitas de ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-láctico (PLA), policaprolactona e, os seus copolímeros ou, a partir de colágeno tipo I, apresentam as melhores propriedades de biocompatibilidade e afinidade celular, proporcionando resultados superiores de regeneração óssea (SCHMITZ et al., 2000). As membranas de colágeno são mecanicamente maleáveis, de fácil manipulação e adaptação. Possibilitam a capacidade semipermeável de passagem de nutrientes, com função hemostática e degradação enzimática natural (OH et al.,2003).

As membranas de colágeno suínas, como a Bio-Guide® são constituídas por colágeno tipo I e tipo III, extraídos de animais com cautelosa purificação através de radiações gama. Os animais precisam passar por um controle rigoroso de cuidados e certificação veterinária para evitar respostas antigênicas do paciente. A Bio-Guide® apresenta duas camadas, uma delas compacta designada para impedir a invasão de tecidos e outra camada porosa que serve para facilitar a integração com o osso neoformado (OH et al.,2003). O tempo de reabsorção da membrana se completa em torno de 4 meses, de acordo com estudos realizados previamente. A utilização de raios gama, além da adição de agentes de ligação cruzada, como glutaraldeído, formaldeído e

compostos poliepóxi podem contribuir para o retardo de tempo de degradação das membranas de colágeno (SCHLEGEL et al., 1997; LEE et al., 2001, OWENS et al., 2001). Mesmo que apresentando um tempo médio de reabsorção curto, as membranas de colágeno cumprem com eficácia a função de barreira seletiva durante período de cicatrização óssea (ZHAO et al. 2000).

#### *Usos terapêuticos do ozônio*

O ozônio para fins medicinais, segundo Nogales *et al.* (2008), teve sua primeira utilização durante a primeira guerra mundial, quando Albert Wolf tratou com sucesso as feridas de soldados alemães em putrefação e com abscessos (NOGALES *et al.*, 2008). Na Odontologia, o alemão Edward A. Fisch foi o primeiro a usar o ozônio, em 1950, na forma de água ozonizada, como antisséptico em cirurgias orais, com o objetivo de aumentar o aporte de oxigênio (AZARPAZHOOH *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2013).

A ozonioterapia é a técnica que utiliza o ozônio como um agente terapêutico. Devido ao seu potencial bactericida, fungicida e virucida, pode ser utilizado na prevenção, controle e tratamento de infecções após osteomielite (FERREIRA *et al.*, 2013). Pode ser empregado para o tratamento de doenças periodontais e peri-implantites, uma vez que os agentes etiológicos dessas infecções são sensíveis ao ozônio (FERREIRA *et al.*, 2014). Tem a capacidade de estimular as defesas imunológicas celulares e humorais em pacientes imunodeprimidos, facilitando a metabolização e eliminação de mediadores inflamatórios como histamina e bradicinina (SEIDLER *et al.*, 2008). Além de atuar como inibidor da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), proporcionando a redução do edema e da dor, favorece o reparo tecidual, o que está relacionado com a sua capacidade de modular o estresse oxidativo biológico (SEIDLER *et al.* 2008; FERREIRA *et al.*, 2013). Quando em contato com fluídos orgânicos, promove a formação de moléculas reativas de oxigênio, as quais influenciam eventos bioquímicos do metabolismo celular, trazendo benefícios ao reparo tecidual (BOCCI *et al.*, 2005). A estimulação da circulação local pode influenciar na produção de citocinas, que juntamente com uma maior disponibilidade de oxigênio celular e aumento de fatores de crescimento, pode promover melhoras no processo de cicatrização (BOCCI *et al.*, 2005; OZDEMIR *et al.*, 2013).

O ozônio (O<sub>3</sub>), é um composto natural, encontrado na natureza na forma de gás, numa concentração de 1-10 ppm (KAZANCIOGLU *et al.*, 2014). É uma molécula triatômica, composta por 3 átomos de oxigênio (O<sub>2</sub>), oriundo na atmosfera de reações fotoquímicas, a partir da divisão das moléculas de oxigênio (NOGALES *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2013). O ozônio utilizado para fins

medicinais é obtido a partir de uma mistura de oxigênio e ozônio puros, sendo que as concentrações máximas de ozônio não devem ultrapassar 5% (NOGALES *et al.*, 2008). Esta concentração limítrofe pode ser explicada por Bocci *et al.* (2002), correspondendo a 100 µg/ml de ozônio, o que significa que a mistura oxigênio-ozônio, apresenta uma proporção de 5% de ozônio em 95% de oxigênio. Assim como nas concentrações de 1 µg/ml, que corresponde a 0,05% de ozônio, sendo esta a dose mais baixa possível de ser administrada nas terapias com ozônio (BOCCI *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2013). Segundo Sagai e Bocci (2011), a janela terapêutica ideal de concentração de ozônio varia de 10 µg/ml a 80 µg/ml. Neste intervalo, é possível promover um estresse oxidativo discreto com eficácia terapêutica, mas sem toxicidade. Segundo Bocci *et al.* (2002), os efeitos tóxicos do ozônio são dependentes da concentração e do tempo de exposição, devido à produção de radicais livres capazes de induzir danos celulares. A utilização do ozônio de forma inalatória, em altas concentrações, apresenta efeitos tóxicos ao sistema pulmonar, decorrentes da formação de subprodutos (SAGAI *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2014). A produção do ozônio ocorre através da passagem de oxigênio puro por uma corrente de alta voltagem, criando um processo denominado de descarga de corona, levando à dissociação das moléculas de oxigênio, o que permite a formação do gás ozônio a partir da união das moléculas de oxigênio (BOCCI *et al.*, 2005).

A ozonioterapia pode ser realizada de maneiras distintas; na forma gasosa, pode ser utilizado um sistema de cânulas para sua administração, apresentando propriedades antimicrobianas eficazes. Entretanto, concentrações elevadas dessa forma de aplicação podem causar efeitos tóxicos (AZARPAZHOOH *et al.*, 2008). A utilização na forma de água ozonizada pode ser utilizada como agente irrigante em cirurgias de extrações dentárias, onde são realizadas osteotomias, reduzindo a ocorrência de complicações infecciosas pós-cirúrgicas. Também é indicada para infecções após osteomielite, bem como, para irrigação de bolsas periodontais (OGUZ *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013). O uso na forma de óleo ozonizado, a partir da mistura do gás com azeite, apresenta maior estabilidade. A partir da ozonização do azeite de oliva, se obtém uma série de compostos chamados de ozonídeos, que possuem ação antimicrobiana, podendo ser aplicados na forma tópica para o tratamento de alveolites, fístulas e infecções odontogênicas. Segundo Nogales *et al.* (2008), a utilização de Oleozón®, que é o óleo de girassol ozonizado, na reparação da alveolite, foi capaz de reduzir o tempo de reparo, devido seu poder de oxigenação dos tecidos, com estimulação acelerada da regeneração tecidual.

## **OBJETIVO**

### *Objetivo geral*

O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da ozonioterapia sistêmica sobre a remodelamento ósseo em ratos submetidos à corticoterapia, com e sem a colocação de xenoenxerto.

### *Objetivos específicos*

1. Comparar os efeitos da ozonioterapia sobre o remodelamento ósseo entre animais controle e submetidos à corticoterapia, por meio de análises histológica.
2. Avaliar o efeito da ozonioterapia sobre o reparo de defeitos ósseos críticos, preenchido com xenoenxerto, comparando animais controle e tratados com glicocorticoides, empregando análises histológica.
3. Avaliar o efeito da ozonioterapia sobre o reparo de defeitos ósseos críticos, com xenoenxerto e recobertos com membrana de colágeno, e comparar em animais controle e tratados com glicocorticoides.

## MATERIAIS E METÓDOS

### *Animais*

Foram utilizados 64 ratos machos Wistar (180-220 g), divididos em 8 grupos (n=8/grupo), de acordo com o tratamento e os procedimentos cirúrgicos. Os animais foram mantidos no Vivário do Prédio 14, da PUCRS. Eles permaneceram em microisoladores, equipados com filtros de entrada e saída de ar, com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 07 h 00 min; luzes apagadas às 19 h 00 min). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha para roedores, em número de 4 animais por gaiola. Os animais receberam ração peletizada (marca Nuvilab) e água filtrada *ad libitum*.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Toxicologia Pré-clínica, do Instituto de Toxicologia e Farmacologia, Prédio 12, PUCRS. Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em  $22 \pm 1$  °C. Foi utilizado um período de adaptação ao novo ambiente de pelo menos 1 h. Todos os experimentos foram realizados entre 8 e 19 h.

Os procedimentos experimentais seguiram as recomendações para o cuidado com animais de laboratório e normas éticas para a experimentação em animais conscientes do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health (NIH). O número de animais, bem como, a intensidade dos estímulos foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes no estudo. Foram respeitados os preceitos apresentados na Lei N° 11.794, de 9 de outubro de 2008 e na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos experimentais foram submetidos à apreciação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia, bem como, à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

### *Desenho experimental e cálculo amostral*

O número de animais por grupo foi determinado com base em trabalhos prévios da literatura internacional, conduzidos com modelos animais de defeitos ósseos críticos em calota craniana, além de modelos de imunossupressão e terapia com ozônio (BOTTURA *et al.*, 2011; KAZANCIOGLU *et al.*, 2013; ERDEMCI *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2014; OZDEMIR *et al.*, 2014; KAN *et al.*, 2015; ALPAN *et al.*, 2016). Foi utilizado o número mínimo de animais necessários para garantir que as conclusões do experimento sejam válidas, dentro de um risco aceitável, sem que haja viés de mensuração de dados (GraphPad InStat, versão 7.0 da GraphPad Software, USA).

Foi utilizado um número total de 64 animais no presente trabalho. Os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos experimentais (N= 8/grupo), de acordo com a indução ou não de imunossupressão, colocação ou não de enxerto e, aplicação ou não de ozônio. A distribuição dos animais nos diferentes grupos está sumarizada na Figura 1.

### *Criação dos defeitos críticos*

Os procedimentos utilizados foram semelhantes aos descritos previamente (KAZANCIOGLU *et al.*, 2013; OZDEMIR *et al.*, 2013; KAN *et al.*, 2015; ALPAN *et al.*, 2016; SEYHAN *et al.*, 2016). Os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados em todos os grupos após 2 semanas de tratamento com o glicocorticoide, dexametasona ou, da administração de veículo no grupo controle. Foi realizada profilaxia antibiótica com cefalexina, (60 mg/kg), 30 min antes dos procedimentos cirúrgicos. Posteriormente, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A confecção dos defeitos críticos na calota craniana dos ratos foi conduzida por um único pesquisador, calibrado antecipadamente, com intuito de proporcionar fidelidade nos procedimentos. Para realizar o acesso à calota dos ratos, primeiramente, foi feita tricotomia da região frontoparietal, com auxílio de depilador e, antissepsia com solução de iodopovidona (10%). O procedimento cirúrgico foi conduzido com cada animal, de forma independente, sobre uma bancada isolada com campo cirúrgico estéril descartável e com troca de material cirúrgico para cada animal. Para estabilizar os animais foi utilizado o aparelho Estereotáxico Schler para permitir o posicionamento de maneira exata durante o procedimento cirúrgico. Após, foi realizada incisão no plano sagital, em formato de meia-lua, no tegumento que reveste a calota craniana, utilizando cabo de bisturi nº 3 e lâmina 15 C de aço carbono, incluindo pele e músculo, até o perióstio. Em seguida, foi feita a divulsão dos músculos envolvidos com tesoura *Metzemaum* e, descolamento do perióstio, elevando a porção lateral do retalho que recobre esta porção óssea, com descolador de *Molt* nº 9 e cinzel de *Oshsenbein* nº 1, expondo a cortical óssea desta região. Após a confecção do retalho mucoperiosteal e exposição do tecido ósseo, foi realizada osteotomia, com irrigação constante com soro fisiológico 0,9% estéril, utilizando uma broca trefina cirúrgica de 5 mm de diâmetro interno, em um contra-ângulo, na velocidade de 800 rpm de um motor elétrico. Foram confeccionados dois defeitos ósseos monocortical de 5,00 x 1,00 mm de diâmetro, transpassando toda a espessura da díploe. Foram tomados todos os cuidados para não ocorrer perfuração da dura-máter adjacente e não envolver a sutura sagital. Após a remoção das tábuas corticais externa e

interna, os defeitos críticos foram preenchidos com coágulo (grupos I, II, V e VI). Nos grupos III, IV, VII e VIII, o defeito foi preenchido com enxerto ósseo Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials, Germany). Em todos os grupos experimentais, o defeito do lado esquerdo do animal foi escolhido para ser recoberto com uma membrana de colágeno reabsorvível Bio-Gide® (Geistlich Biomaterials, Germany), para fins de comparação, em relação ao perfil de neoformação óssea (Figura 2). A seguir, os retalhos foram reposicionados e suturados, com fio Mononylon Shalon 4-0 de secção cilíndrica, com pontos isolados. A região foi limpa com gaze umedecida em soro fisiológico, para remoção dos resíduos orgânicos e os animais foram colocados na posição de decúbito ventral, em suas gaiolas correspondentes, para a recuperação da anestesia. Os animais foram acompanhados até a total recuperação da anestesia e receberam medicação analgésica (paracetamol, 50 mg/kg) por via intraperitoneal, durante 48 horas do pós-operatório (KIMURA et al., 2012). As suturas foram removidas uma semana após os procedimentos.

#### *Indução de imunossupressão*

Foi realizada a administração crônica de dexametasona, de acordo com os modelos descritos previamente, com adaptações (KOMORI, 2015; FERNANDES *et al.*, 2009; 2010; MARTINS *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2014). De acordo com os estudos anteriores, é possível observar que após um período de trinta dias de uso de corticoide sistêmico, os animais apresentaram diminuição de peso, alopecia, letargia, além da redução da atividade e do número de osteoblastos, menor área de osso neoformado. Os animais dos grupos II, IV, VI e VIII foram tratados com dexametasona (5 mg/kg), por via intraperitoneal, a cada 48 horas, por 2 semanas, previamente aos procedimentos cirúrgicos para confecção dos defeitos ósseos e/ou enxertia. Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram tratados por mais 4 semanas, com a mesma dose de dexametasona, até o momento da eutanásia, como descrito posteriormente. Os animais dos grupos I, III, V e VII foram tratados nos mesmos períodos de tempo, por via intraperitoneal, com veículo (NaCl 0,9%; 10 ml/kg).

#### *Terapia com Ozônio*

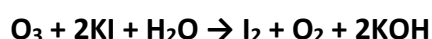
Foi empregado o protocolo de ozonioterapia descrito previamente (ERDEMCI *et al.*, 2014; KAN *et al.*, 2015). Os animais nos grupos V, VI, VII e VIII foram tratados, por via intraperitoneal, com uma mistura contendo O<sub>3</sub> e O<sub>2</sub>, nas concentrações de 97% e de 3%, respectivamente, na dose de 0,7 mg/kg. Para tal, foi utilizado o Gerador de Ozônio OZ 10.E (OZ Indústria de Equipamentos

Geradores de Ozônio Ltda, Porto Alegre, Brasil). A terapia com ozônio foi realizada no Laboratório de Toxicologia Pré-clínica, Bloco D, prédio 12 da PUCRS. O tratamento foi realizado nas quatro semanas antes da eutanásia, iniciando, imediatamente após a criação dos defeitos críticos.

#### *Calibração do gerador de ozônio*

Para viabilizar o trabalho em condições conhecidas das concentrações de ozônio, é necessário que haja a quantificação da produção de ozônio entregue pelo aparelho gerador. A calibração do ozonizador é realizada através do método iodométrico (Standard methods for the examination of water and waste water da AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION) (GILCREAS FW, 1966).

Primeiramente são ajustadas a vazão de O<sub>2</sub> em 1L/min entregues ao gerador de ozônio. Após, de acordo com o método iodométrico na qual, uma solução de iodeto de potássio 2% (KI), reage com o ozônio entregue durante um minuto pelo gerador de ozônio, ocorre a liberação do iodo, de acordo com a seguinte fórmula:



No processo de ozonização, a solução de iodeto de potássio, rapidamente, torna-se alcalina. Após a ozonização, a solução de iodeto de potássio ozonizada é acidificada com ácido sulfúrico 1N. Através da acidificação, faz-se com que o iodo seja liberado. O iodo liberado é titulado com solução padrão de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) até que esta solução de torne transparente. Marca-se o volume total de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) utilizado (WARDANI S et al.,1996).

O cálculo da produção de ozônio em (g O<sub>3</sub>/h) é realizado a partir da seguinte fórmula:

$$P = \frac{N_t \times \Delta v_t \times V_{ki} \times 24000 \times 60}{V_{amostra} \times t \times 1000}$$

**P**= produção de ozônio (g O<sub>3</sub>/h).

**N<sub>t</sub>**= normalidade do tiosulfato (0,0243).

**Δv<sub>t</sub>**= variação de tiosulfato consumido na titulação.

**V<sub>ki</sub>**= volume da solução de iodeto de potássio 2% ozonizada.

**V<sub>amostra</sub>**= volume da amostra coletada para titulação.

**T**= tempo de entrega do ozônio pelo ozonizador.



### *Eutanásia e coleta de amostras*

Os procedimentos de eutanásia e coleta de amostras foram realizados no Laboratório de Toxicologia Pré-clínica, Bloco D, prédio 12 da PUCRS. Transcorridas quatro semanas da confecção dos defeitos críticos, os animais foram eutanasiados por inalação de sevoflurano. Em seguida, foram coletadas as calotas cranianas com a pele sobreposta. Para a obtenção da peça operatória de interesse, foi realizada uma incisão na porção parietal utilizando cabo de bisturi nº 3 e lâmina nº 15 C de aço carbono. O tecido de pele e músculo da região foram removidos com o auxílio de tesoura Metzemaum e pinça Adson Brown para visualização completa da região. Foi realizada osteotomia da região de calota craniana com margens de segurança dos defeitos de interesse de 4 mm, utilizando broca multilaminada tronco-cônica nº 702 em baixa rotação e sob irrigação constante de soro fisiológico 0,9%. As amostras foram fixadas em formol tamponado 10% durante sete dias para as análises posteriores.

A linha de tempo experimental, desde o início do tratamento com dexametasona, passando pela cirurgia, ozonioterapia, até a eutanásia, está representada na (Figura 3). Após a eutanásia e necropsia, os animais foram considerados como lixo biológico, sendo os mesmos congelados e recolhidos seguindo as normas do CeMBE, PUCRS.

### *Análise histológica*

As amostras foram submetidas à descalcificação em EDTA (17 %), pH 7,2, em temperatura ambiente, por quarenta e cinco dias, com trocas diárias no Laboratório de Patologia da PUCRS. Concluída a descalcificação, as peças foram incluídas em parafina para a confecção de blocos, que foram cortados em cortes semi-seriados em espessura de 4 µm, no sentido laterolateral na região mais central do defeito ósseo. Para a análise histológica, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Foram selecionados 4 sítios de cada espécime, após realizado captura da imagem em aumento de 10x e 20X em microscópio (Axio Imager A1) acoplado a um sistema de captura de imagem (Axio Vision Rel. 4.4 Software Multimedia), ambos da Imaging Solution Carl Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha). Além disso foi utilizado o microscópio Stereo Stemi DV<sub>4</sub> da Imaging Solution Carl Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em 4X de aumento e câmera digital (DS-5M-L1; Nikon, NY, USA) acoplada. As imagens digitalizadas foram transferidas para um computador e avaliadas através do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA). Foram utilizadas variáveis qualitativas para o exame histológico, de acordo com o

estudo de Alan H et al.,2015, baseado no aspecto do trabeculado ósseo, atividade osteoblástica em torno da matriz óssea, padrão de formação de tecido conjuntivo na área do defeito, e existência de partículas de enxerto na região.

#### *Análise estatística*

A análise estatística dos resultados dos pesos corporais dos animais, bem como do peso dos baços, foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey e teste Post Hoc. Valores de P menores do que 0,05 foram considerados como indicativos de significância.

## RESULTADOS

Os experimentos ocorreram sem intercorrências do ponto de vista de cicatrização dos animais em todos os grupos, na qual os animais se mantiveram com ausência de processos inflamatórios, reações alérgicas, bem como exposição dos materiais de enxertia. Houveram três perdas de animais durante os experimentos e que ocorreram devido a indução de anestesia, na qual devido a etapa que aconteceu, possibilitou a reposição imediata dos animais nos respectivos grupos evitando possíveis prejuízos a análise dos resultados.

Todos os animais foram pesados diariamente durante o experimento, antes da administração de dexametasona/veículo. A mudança nos pesos dos animais é um importante dado que reflete o sinal do crescimento ou atraso do desenvolvimento como influência dos efeitos sistêmicos da imunossupressão e pode ser avaliado na (Tabela 1). As alterações de comportamento e dificuldade de ganho de peso, foram características dos animais em uso contínuo de glicocorticoides, uma vez que esta é uma reação adversa esperada neste grupo de tratamento. É possível observar um ganho crescente e diário nos pesos dos animais dos grupos I, III, V, VII revelando significância estatisticamente maior para valores ( $p < 0,05$ ). Nos grupos II e IV, pode-se analisar perda progressiva do peso dos animais em comparação com os animais controle do grupo I e III. Os grupos VI e VIII, que receberam a intervenção de dexametasona e ozônio terapia sistêmica concomitantes, mostraram uma evolução mais positiva no ganho de peso em relação aos animais do grupo II, na qual receberam apenas dexametasona, demonstrando que o ozônio possibilita uma melhora no quadro sistêmico geral dos animais. O baço, que é um órgão imunológico, foi coletado e pesado de todos animais após a eutanásia. Foi realizado a mensuração dos pesos e realizado um índice ao peso do baço em relação ao peso do animal, que pode ser analisado na (Tabela 2). Assim, a fórmula para calcular o índice do órgão foi, o peso do baço dividido pelo peso corporal total do animal no momento da eutanásia. A atrofia dos baços foi uma característica dos animais imunodeprimidos nos grupos II e IV. Nos grupos VI e VIII, nos quais os animais receberam a terapia associada com o ozônio, foi possível avaliar um aumento significativo dos pesos dos baços, tendendo a uma normalização, assim como nos grupos I e III que não receberam nenhuma intervenção, sendo este um efeito positivo do tratamento na redução do quadro de imunossupressão causado pela dexametasona.

A análise histológica qualitativa das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), no grupo I (Figura 4 A e B, Figura 5), revela que a cicatrização se caracterizou pela presença de tecido fibroso, com grande quantidade de fibras colágenas orientadas paralelamente em relação ao

defeito ósseo, associado a vasos sanguíneos, com baixa quantidade de tecido ósseo recém-formado na proximidade dos bordos da ferida. No grupo II (Figura 6 A e B; Figura 7) é possível ver características semelhantes as encontradas no grupo I. Em análise qualitativa comparativa (Figura 20), o tratamento com a dexametasona demonstra atraso do ponto de vista de cicatrização óssea, na qual a faixa de osso neoformada se apresenta mais delgada em relação ao grupo I, discreta presença de linfócitos e macrófagos são observados. Nos grupos III e IV, nos quais foram adicionados xenoenxerto bovino, é possível avaliar a presença de partículas de enxerto ósseo residual na porção central do defeito, presença de osso imaturo nas proximidades das bordas do defeito e dos remanescentes de enxerto encapsulados por tecido conjuntivo fibroso (Figura 21). No grupo III (Figura 8 A e B), a presença da membrana de colágeno se mostra um fator positivo a regeneração óssea, devido a seletividade celular que ela proporciona. Isto pode ser avaliado na (Figura 9) que revela atividade osteoblástica aumentada, devido à grande quantidade destas células nas proximidades da matriz óssea. A presença da formação de uma camada superficial de partículas ósseas enxertadas pode ser avaliada nas periferias do osso recém-formado nos bordos do defeito.

No grupo V (Figura 12 A e B), foi proposto a terapia com ozônio, onde é possível ver grande quantidade de trabéculas de tecido ósseo não lamelar nas bordas dos defeitos, além da presença de muitas células de linha osteoblástica e osteócitos localizados na matriz óssea, demonstrando o processo de reparo ósseo ativo. Na figura 22, é possível visualizar um atraso na cicatrização, como reflexo do tratamento com a dexametasona, no entanto a intervenção do ozônio permite que se formem maiores áreas de tecido ósseo, em relação ao grupo II. A comparação qualitativa entre os grupos I e V (Figura 24), revelou claramente uma maior proporção do defeito preenchidas com tecido ósseo imaturo e presença de tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos, o que demonstra o resultado positivo do tratamento com ozônio. O grupo VII (Figura 16 A e B), no qual foi realizado a colocação de enxerto associado a terapia com ozônio, foi o grupo com os melhores resultados, uma vez que apresentou organização tecidual com mais de dois terços do defeito preenchidos por matriz óssea imatura, presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas bem orientadas, presença de muitas células mononucleares, macrófagos e linfócitos e ósseointegração do xenoenxerto, com presença de osteoblastos e osteoclastos nas periferias da matriz óssea (Figura 17). No grupo VIII, assim como no grupo VII a regeneração óssea se mostrou ativa através do preenchimento de mais de dois terços do defeito ósseo (Figura 23), no entanto maior quantidade de tecido conjuntivo fibroso cobrindo as superfícies do defeito podem ser visualizados

com lacunas de reabsorção ocupados por osteoclastos nas proximidades das partículas do enxerto (Figura 18 A e B; Figura 19). Em todos os grupos, a presença da membrana de colágeno tipo I, expresso nas (Figuras A) de cada imagem, permitiu um avanço positivo dos processos de cicatrização, devido a sua característica de barreira mecânica, que proporciona a seletividade de células osteogênicas, fibroblastos, e aumento de células endoteliais vasculares, se mostrando um importante mecanismo adjuvante a cicatrização dos defeitos ósseos.

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi utilizado um defeito crítico na calvaria dos ratos de 5mm, que a partir desta medida não ocorre uma cicatrização espontânea em toda a extensão do defeito (KAZANCIOGLU et al., 2013). Este dado pode ser observado a partir da análise dos defeitos do grupo controle, que se mostrou com a menor área de neoformação óssea. O modelo utilizado apresenta facilidade de padronização das amostras, possibilitando a análise dos processos de cicatrização óssea através de uma mensuração simples.

A osteoporose (OP) é uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por alterações estruturais na qualidade e quantidade óssea, que provoca menor resistência óssea, e maior suscetibilidade de fraturas (TSOLAKI IN et al. 2009; DOWNEY e SIEGEL, 2006). Mesmo sendo uma doença silenciosa, os transtornos causados aos indivíduos portadores desta condição e as altas taxas de mortalidade, tornam a osteoporose um importante problema de saúde pública (HSU E e NANES MARK 2017). A osteoporose secundária, é uma condição caracterizada pela perda óssea a partir de condições médicas, ou do uso de medicações que resultam em fragilidade óssea. Diante da grande lista de fármacos precursores da doença, destaca-se os glicocorticoides (GCs). Os GCs, são utilizados no tratamento de diversas patologias, com potente ação anti-inflamatória e imunossupressora, considerados a causa mais comum de osteoporose secundária, provocando graves efeitos deletérios ao osso (HSU E e NANES MARK 2017; CANALIS E et al. 2007). O uso crônico de GCs provoca um desequilíbrio nos processos fisiológicos de remodelamento ósseo, interferindo na diferenciação e maturação de osteoblastos que refletem em uma supressão na formação óssea, bem como no aumento da reabsorção, que são características na patogênese da osteoporose induzida por glicocorticoides (OPIC) (RIZZOLI et al. 2012; CANALIS E et al. 2007).

A OPIC pode ser investigada através de modelos animais, como em rato, coelho, camundongo além de cachorro e ovelha, nos quais os roedores são o modelo experimental mais amplamente utilizado para avaliar a ação dos GCs no osso (KOMORI T, 2015; FERNANDES et al.,2009; 2010; MARTINS et al.,2012; GARCIA et al., 2014). De acordo com ORTOFT et al.,1999, a injeção de metilprednisolona nas doses (1,3,4,9mg/kg/dia) em ratos Wistar jovem, durante noventa dias, apresentou baixo remodelamento ósseo, com redução do osso cortical nas doses iniciais e redução do osso esponjoso nas dosagens maiores. No entanto, de acordo com a revisão de Komori T (2015), o que se observa é que o modelo dos roedores não apresenta uma redução do osso esponjoso de forma consistente. Em nosso estudo, foi utilizado o modelo de ratos Wistar jovens, com tratamento de dexametasona (5mg/kg/dia) aplicado intraperitoneal, a cada 48 horas,

durante seis semanas. Foi possível avaliar que nos grupos II e IV, ocorreu menor reparo ósseo dos defeitos, comparado aos demais grupos que não receberam tratamento com GCs. Este dado corrobora com os achados de (GARCIA VG et al., 2014), que é explicado devido associação de altas doses de corticoide de uso crônico, o qual provoca uma redução da atividade osteoblástica, ocasionando menor formação óssea.

A membrana de colágeno tipo I que foi utilizada com o intuito de criar um isolamento na área do defeito, se mostrou um recurso previsível para o remodelamento ósseo. Em nosso estudo, foi possível avaliar através de análise histológica qualitativa o aumento da área de osso neoformado em comparação com os defeitos contralaterais em que não se utilizava a membrana de colágeno. Isto pode ser visto através da angiogênese aumentada bem como do maior número de osteoblastos e osteoclastos na periferia da matriz óssea, proporcionando um remodelamento ósseo ativo. Este dado vai de encontro com o estudo realizado por (BASUDAN A et al 2016; e NOOH N et al.2016), que comparam através de análise micro tomográfica, o uso de membrana reabsorvível de colágeno, durante regeneração óssea guiada de defeitos críticos na calota de ratos, na qual é expresso com um aumento na formação óssea e diminuição das taxas de reabsorção óssea.

A utilização de materiais para enxertia, a base de recursos naturais, para o preenchimento de defeitos ósseos, como é o caso dos xenoenxertos, são alternativas crescentes nas investigações em modelos experimentais em ratos (MIRON RJ et al.,2016; NOOH N et al.,2016; KIM SS et al.,2008). Embora os enxertos autógenos sejam considerados o “padrão ouro” devido seu potencial osteogênico, eles requerem maior tempo cirúrgico e estão associados a maior morbidade (NEUKAM FW et al 1994). Além disso, existe uma alta taxa de reabsorção em torno destes enxertos, que pode ser constatado através do estudo de (JOHANSSON B et al 2001), na qual avaliou a estabilidade volumétrica de enxertos autógenos inlay e onlay após 6 meses de pós-operatório, demonstrando taxa de redução de 49,5% do volume inicial. A reabsorção do enxerto deve acontecer em momento apropriado para viabilizar um suporte mecânico para a ativação de células osteogênicas (DONOS N et al. 2004). Estudos tem demonstrado a lenta reabsorção dos xenoenxertos, na busca de ganho ósseo, proporcionando resultado satisfatórios (POULIAS E et al2013; HALLMAN M et al.2005). Assim, o biomaterial de escolha foi o xenoenxerto, que é um osso bovino mineral desproteínizado, para o preenchimento das áreas defeituosas (KIM SS e KIM BS 2008). No presente estudo, o uso do xenoenxerto (Bio-Oss®) foi avaliado, possibilitando a reconstrução dos defeitos, com reabsorção mínima do material. As propriedades osteocondutivas

e um perfil lento de reabsorção foram demonstrados durante o período de cicatrização dos defeitos. Os grupos III, IV, VII, VIII demonstraram as maiores áreas de formação óssea em relação aos respectivos grupos controles, devido a presença do xenoenxerto. A manutenção de partículas de enxerto encapsulados por tecido conjuntivo na área central dos defeitos foi característico nos grupos III e IV, sendo que nos grupos VII e VIII, na qual houve a associação do tratamento com ozônio terapia, é possível avaliar uma maior reabsorção das partículas de xenoenxerto com aumento ósseo, que possibilitou o preenchimento de quase a totalidade do defeito crítico. A capacidade de manter as partículas do enxerto intactas na área central do defeito, com baixa taxa de reabsorção, revelam uma importante propriedade do xenoenxerto bovino na busca pela manutenção do volume ósseo local.

Diversas modalidades de tratamento adjuvante, no intuito de melhorar a cicatrização óssea são pesquisados, como reposições hormonais, uso de laser de baixa potência (LLLT), oxigênio terapia hiperbárica (HBO), e mais recentemente a ozônio terapia (ALPAN AL et al. 2016; KAN B et al.2015; KAZANCI OGLU HO et al.2013). O presente estudo teve por objetivo avaliar o impacto do ozônio nos processos de cicatrização óssea em defeitos críticos preenchidos com xenoenxerto bovino de ratos com imunossupressão induzida pelo tratamento com dexametasona. Os resultados demonstram que a ozônio terapia sistêmica possibilita um aumento de osso recém-formado, e acelera o remodelamento do xenoenxerto. Este dado pode ser avaliado qualitativamente no aspecto histológico dos grupos V, VI, VII, VIII. Em contraste, os grupos que receberam o tratamento com dexametasona, devido as suas repercussões negativas na microarquitetura óssea, demonstraram o maior atraso na cicatrização em relação aos grupos controle. No entanto, de acordo com a (Tabela 3), nos grupos VI e VIII que receberam ambos os tratamentos, verifica-se, a presença de tecido conjuntivo mais organizado com fibras colágenas orientadas paralelas entre si, trabéculas de osso neoformado e maior número de células osteogênicas na periferia dos defeitos confirmado através do aspecto histológico visto na (Figura 22 e 23). Os mecanismos biológicos de interferência da entrega de oxigênio nas reações com componentes sanguíneos do sistema vascular, bem como a capacidade imunomoduladoras do sistema de defesa antioxidante, repercutem em efeitos terapêuticos positivos da terapia com ozônio (ALPAN AL et al.2016; OZDEMIR et al.2013). Estudos experimentais recentes demonstram resultados promissores a nível de remodelamento ósseo associado as terapias com ozônio. OZDEMIR et al.2013, concluiu que a associação do enxerto autógeno com o ozônio tópico aplicado na concentração de (80% de oxigênio) por 30s, três vezes ao dia, durante duas semanas, resultou



em maior formação óssea do que o enxerto utilizado sozinho. Resultado similar ao encontrado no estudo de (ALPAN AL et al.2016), que avaliou a cicatrização de defeitos críticos na calvaria de ratos diabéticos, tratados com ozônio tópico, demonstrou aceleração nos estágios iniciais dos processos de cicatrização após quatro semanas de pós-operatório. Em nosso estudo realizamos a utilização de ozônio sistêmico, através de aplicações diárias durante sete dias de pós-operatório, por via intraperitoneal, com uma mistura contendo O<sub>3</sub> e O<sub>2</sub>, nas concentrações de 97% e de 3%, respectivamente, na dose de 0,7 mg/kg. A escolha por esta via de administração é sustentada a partir dos resultados positivos da utilização sistêmica do ozônio encontrados no estudo de (ERDEMCI et al. 2014), que compara o efeito da aplicação sistêmica e tópica de ozônio na cicatrização de alvéolos dentários após a extração em ratos. A utilização sistêmica no pré-operatório e pós-operatório resultou em maior formação de osso trabecular em comparação com a aplicação tópica. De acordo com a análise histológica qualitativa, foi possível avaliar que o uso do ozônio possibilitou uma maior formação de tecido ósseo nos defeitos críticos da calvaria de ratos na presença de xenoenxerto, evidenciando aceleração nos processos de cicatrização através da reabsorção das partículas do enxerto e formação de matriz óssea imatura em toda a extensão do defeito. A terapia com dexametasona implica em graves consequências a nível de remodelamento e na mineralização óssea em vários níveis (KIM et al. 2009). Os resultados da deterioração na microarquitetura óssea através dos aumentos nas taxas de reabsorção óssea bem como diminuição da neoformação óssea podem ser vistos no estudo de (GOVINDARAJAN P et al. 2013), na qual indica um aumento nos níveis de osteoclastogênese e significativa diminuição da densidade mineral óssea (DMO), em animais com osteoporose em terapia a longo prazo com glicocorticoides. Em nosso estudo, os animais dos grupos que receberam a terapia com glicocorticóides, demonstraram histologicamente um atraso na cicatrização. No entanto, nos grupos VI e VII, pode-se analisar uma maior taxa de formação óssea, mesmo que haja um retardo na cicatrização, porém a terapia com ozônio possibilitou o desenvolvimento de uma maior área óssea ao longo da superfície dos defeitos.

Outro efeito colateral do tratamento com glicocorticoides de uso crônico, é referente as interferências sistêmicas em relação a significativa dificuldade no aumento do peso corporal dos animais. Este efeito é provavelmente resultante da reduzida capacidade de absorção intestinal de nutrientes causado pela droga. Os resultados encontrados são semelhantes ao do trabalho de (GARCIA VG et al.2014). O gráfico da evolução do peso dos animais nos respectivos grupos durante o período de tratamento pode ser avaliado na (Tabela 1). A imunossupressão causada pela terapia

com glicocorticoides foi analisada através da análise dos pesos dos baços dos animais. Naqueles que receberam o tratamento com GCs, é observado redução no tamanho e peso demonstrando resultado estatisticamente significativo para valores de ( $p < 0.05$ ). Por outro lado, é possível analisar os efeitos do ozônio terapia na imunossupressão através da minimização da redução do peso dos baços, que é um órgão imunológico e expressa a condição de interferência do glicocorticoide através da atrofia do órgão. Nos animais dos grupos VI e VIII tratados com dexametasona e que receberam a terapia com OZ, é possível observar que o peso do baço se manteve semelhante do que nos animais dos grupos I e III que não receberam nenhum tratamento.

Diante do exposto e dentro das limitações do estudo, pode-se concluir que a combinação de enxertos ósseos xenógenos e a ozônio terapia sistêmica (em uma mistura contendo  $O_3$  e  $O_2$ , nas concentrações de 97% e de 3% respectivamente) viabilizou a cicatrização óssea em defeitos críticos que foram criadas cirurgicamente na calota de ratos imunossuprimidos. As influências positivas da associação da membrana de colágeno tipo I, possibilita uma regeneração óssea guiada e cria um ambiente seletivo para a estimulação de células osteogênicas, que pode ser visto durante todo o experimento, através das maiores áreas de neoformação óssea ao longo da superfície dos defeitos. Os efeitos do ozônio terapia sistêmica, através do aumento do aporte de oxigênio na microcirculação, permitiu a inibição dos efeitos deletérios do tratamento com glicocorticoides, tanto a nível sistêmico, através da estabilização dos pesos dos animais e da diminuição da atrofia dos baços, quanto a nível de tecido ósseo, através dos estímulos no remodelamento, minimizando os efeitos inibitórios no osso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alan H, Vardi N, Ozgur C, Huseyin A, Yolcu U, Dogan DO. Comparison of the Effects of Low-Level Laser Therapy and Ozone Therapy on Bone Healing. *The Journal of Craniofacial Surgery*.2015;26(5).

Alpan AL, Toker H,Ozer H. Ozone Therapy Enhances Osseous Healing In Diabetic Rats With Calvarial Defect: A Morphometric and Immunohistochemical Study. *J Periodontology*. 2016.

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

Basudan A, Babay N, Ramalingam S, Nooh N, Al-Kindi M, Al-Rasheed A, Al-Hezaimi K. Efficacy of Mucograft vs Conventional Resorbable Collagen Membranes in Guided Bone Regeneration Around Standardized Calvarial Defects in Rats: An In Vivo Microcomputed Tomographic Analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2016;36:109-21.

Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, van Steenberghe D, Higuchi K, Kultje C. The use of e-PTFE barriermembranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*.1994; 9: 31-40.

Blokhuis TJ, Termaat MF, den Boar FC, Patka P, Bakker FC, Haarman HJThM. Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. *J Trauma* 2000; 48:179–186.

Bocci V. *Ozone: a new medical drug*. Dordrecht: Springer.2005.

Bocci V. The clinical application of ozone therapy.In: *Ozone, a new medical drug*. Itália: Springer; 2005: 214-218.

Bocci V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation in *Oxygen ozone therapy*. Springer;2002.

Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res*.2006; 37:425–435.

Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep*. 2013; 4(2): 447.

Bottura PE., Milanezi J, Fernandes LA, Caldas HC, Abbud-Filho M, Garcia VG, Baptista MASF. Nonsurgical Periodontal Therapy Combined with Laser and Photodynamic Therapies for

Periodontal Disease in Immunosuppressed Rats. Transplantation Proceedings, 2011; 43, 2009–2016.

Bourne H. The Biochemistry and Physiology of Bone. Academic Press. 1972;1: 237-257.

Boyce FB, Rosenberg E, Papp AE, Duong LT. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. European Jour of Clinical Investig.2012; 42(12): 1332-1341.

Brunette, D.M; Tengvall, P; Textor, M; Thomsen, P. “Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications”. Springer-Verlag. 2001: 20- 28.

Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. Periodontology. 2000;1999(19):151–63.

Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. Osteoporos Int. 2007;18(10):1319-28.

Carvalho PSP, Bassia APF, Violin LA. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. Implant News. 2004;1(3).

Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. Trends Mol Med.2014;20(8): 449-459.

Chavassieux PM, Arlot ME, Roux JP. Effects of alendronate on bone quality and remodeling in glucocorticoid-induced osteoporosis: a histomorphometric analysis of transiliac biopsies. J Bone Miner Res.2000; 15:754-762.

Cignachi NP, Pesquero JB, Oliveira RB, Etges A, Campos MM. Kinin B1 Receptor Deletion Affects Bone Healing in Type 1 Diabetic Mice. J Cell Physiol. 2015; 230(12):3019-28.

Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. Clin Implant Dent Relat Res. 2003; 5:154–60.

Cormack DH. Fundamentos de Histologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003: 95-112.

Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. Lancet 2002; 359:1761–7.

Downey PA, Siegel MI. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis Physical Therapy. 2006;86(1):77–91.

Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Obter S, Gulses A, Gunal A, Sezgin S, Bayar GR, Dogan N, Gider IK: 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.

Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Martins TM, Okamoto T, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 2009;36: 219-228.

Fernandes LA, Martins TM, Almeida JM, Theodoro LH, Garcia VG. Radiographic assessment of photodynamic therapy as an adjunctive treatment on induced periodontitis in immunosuppressed rats. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(3):237-43.

Ferreira R, Sant'ana ACP, Rezende MLR, Gregghi SLA, Zangrando MSR; Damante CA. Ozone therapy: an actual and critical view about its application in periodontology and implantology-Literature Review. *Innov Implant J, Biomater Esthet.* 2014; 9(2/3):35-39.

Ferreira S, Mariano RC, Garcia Júnior IR, Pellizer EP, Ozone therapy in infection control in oral surgery. *Rev Odonto Araçatuba.* 2013;34(1):36-38.

Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJ, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med.* 2014;44(1):37-53.

Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, Fernandes LA, Gualberto Junior EC, Novaes VCN, Ervolino E, Almeida JM, Theodoro LH. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *Jour Cranio-Maxillo-Facial Surg.* 2014; 42.p:1196-1202.

Gilcreas FW. Standard methods for the examination of water and waste water. *Journal of public health.* 1966;56(3):387-388.

Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, Bocker W, Huerter B, Durselen L, Faulenbach M, Heiss C. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(6):387-398.

Hansen KE, Kleker B, Safdar N, Bartels CM. A systematic review and meta-analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis in children. *Semin Arthritis Rheum.* 2014;44(1):47-54.

Heaney RP. Is the paradigm shifting? *Bone.* 2003; 33:457–65

Hsu E, Nanes M. Advances in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017; 24:000–000

Jensen SS, Brogginini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.*2006; 17:237-243.

Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxila. *Dentomaxillofacial. Radiol.*2001;30: 157-161.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.*12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013: 131-149.

Kan B, Sencimen M, Bayar GR, Korkusuz P, Coskun AT, Korkmaz A, Bahador E, Zerener T. Histomorphometric and Microtomographic Evaluation of the Effects of Hyperbaric Oxygen and Systemic Ozone, Used Alone and in Combination, on Calvarial Defect Healing in Rats. *J Oral Maxillofac Surg.*2015; 73:1231.

Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of Laser and Ozone Therapies on Bone Healing in the Calvarial Defects. *J Craniofac Surg* 2013; 24: 2141-2146.

Kazancioglu HO, Kurklu E, Ezirganli S. Effects of ozone therapy on pain, swelling, and trismus following third molar surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014; 43:644-648.

Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinol.*2001; 142(12):5050-5055.

Kim HJ: New understanding of glucocorticoid action in bone cells. *BMB Rep* 2010; 43:524-529.

Kim RW, Kim JH, Moon SY. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery* (2016) 38:26.

Kim SS, Kim BS. Comparison of osteogenic potential between apatite-coated poly(lactide-co-glycolide) /hydroxyapatite particulates and Bio-Oss. *Dent Mater J.* 2008 May;27(3):368-75.

Kimura M, Obata H, Saito S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. *Anesth Analg.* 2012 115(2):443-9.

Kohal RJ, Gubik S, Strohl C, Stampf S, Bachle M, Hurrle AA, Patzelt SB. Effect of two different healing times on the mineralization of newly formed bone using a bovine bone substitute in sinus floor augmentation: a randomized, controlled, clinical and histological investigation. *J Clin Periodontol.*2015; 42:1052-1059.

Komori T. Animal models for osteoporosis. *Eur J Pharmacol.* 2015 Jul 15;759:287-94.

Kountz DS, Clark CL. Safely withdrawing patients from chronic glucocorticoid therapy. *Am Fam Physician* 1997; 55:521-30.

Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.*2001; 221:1-22.

Le Geros RZ. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. *Monographs in Oral Science.*1991; 15.

Lekovic V, Kenney EB, Carranza Jr. FA, Danilovic V. Treatment of class II furcation defects using porous hydroxyapatite in conjunction with polytetrafluoroethylene membrane. *J Periodontol.* 1990;61: 575–578

Lemos CAA, Mello CC, dos Santos DM, Verri FR, Goiato MC, Pellizzer EP. Effects of platelet-rich plasma in association with bone grafts in maxillary sinus augmentation: a systematic review and metaanalysis *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2016; 45: 517–525.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.* Guanabara Koogan. 2005. 4. Edição, São Paulo.

Hallman M<sup>1</sup>, Sennerby L, Zetterqvist L, Lundgren S. A 3-year prospective follow-up study of implant-supported fixed prostheses in patients subjected to maxillary sinus floor augmentation with a 80:20 mixture of deproteinized bovine bone and autogenous bone. Clinical, radiographic and resonance frequency analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(3):273-80.

Martins TG, Gama JB, Fraga AG, Saraiva M, Silva MT, Castro AG, Pedrosa J. Local and regional re-establishment of cellular immunity during curative antibiotherapy of murine *Mycobacterium ulcerans* infection. *PLoS One.* 2012; 7(2): 327-40.

Martins TG, Trigo G, Fraga AG, Gama JB, Longatto-Filho A, Saraiva M, Silva MT, Castro AG, Pedrosa J. Corticosteroid-Induced Immunosuppression Ultimately Does Not Compromise the Efficacy of Antibiotherapy in Murine *Mycobacterium ulcerans* Infection. 2012; 6(11).

- Mazziotti G, Formenti AM, Adler RA, Bilezikian JP, Grossman A, Sbardella E, Minisola S, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiological role of GH/IGF-I and PTH/VITAMIN Daxes, treatment options and guidelines. *Endocrine*. 2016;54(3):603-611.
- Mazock JB, Schow SR, Triplett RG. Proximal tibia bone harvest: review of technique, complications, and use in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants*.2004; 19:586–593
- Miron RJ, Zhang YF.Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res*.2012; 91:736–744.
- Miron, R.J., Zhang, Q., Sculean, A. Buser D, Pippenger BE, Dard M, Shirakata Y, Chandad, Zhang Y. Osteoinductive potential of 4 commonly employed bone grafts. *Clin Oral Invest*.2016:1-7
- Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant. Dent* 1993; 2:158-167.
- Mish CA. *Implantes dentários contemporâneos*. Ed Santos.2000. Capítulos 29-30: 451-493.
- Murugan R & Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*. 2005; 65:2385-2406.
- Neukam FW. Experimental study using free autogenous bone graft for sinus floor augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994; 6:125-31.
- Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, LageMarques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9(4):75-84.
- Nooh N, Ramalingam S, Al-Kindi M, Al-Rasheed A, Al-Hamdan KS, Al-Hezaimi K. Real-Time Assessment of Guided Bone Regeneration in Standardized Calvarial Defects in Rats Using Bio-Oss With and Without Collagen Membrane: An In Vivo Microcomputed Tomographic and Histologic Experiment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2016;36 Suppl:s139-49.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982;9(4):290–6.
- Oguz E, Ekinci S, Eroglu M, Bilgic S, Koca K, Durusu M, Kaldirim U, Sadir S, Yurttas Y, Cakmak G, Kilic A, Purtuloglu T, Ozyurek S, Cekli Y, Ozkan H, Sehirlioglu A. Evaluation and comparison of the effects of hyperbaric oxygen and ozonized oxygen as adjuvant treatments in an experimental osteomyelitis model. *J Surg Res*. 2011; 171(1):61-68.



Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(1):80-90.

Oki Y, Doi K, Makihara Y, Kobatake R, Kubo T, Tsuga K. Effects of continual intermittent administration of parathyroid hormone on implant stability in the presence of osteoporosis: an in vivo study using resonance frequency analysis in a rabbit model. *J Appl Oral Sci.* 2017 ;25(5):498-505.

Ortoft G, Andreassen TT, Oxlund H. Growth hormone increases cortical and cancellous bone mass in young growing rats with glucocorticoid-induced osteopenia. *J Bone Miner Res.* 1999;14(5):710-21.

Oue H, Doi K, Oki Y, Makihara Y, Kubo T, Perrotti V, Piattelli A, Akagawa Y, Tsuga K. Influence of implant surface topography on primary stability in a standardized osteoporosis rabbit model study. *J Funct Biomater.* 2015;18;6(1):143-52.

Owens, K.W. & Yukna, R.A. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dentistry.* 2001; 10: 49–56.

Ozdemir H, Toker H, Balcı 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.

Park JW, J.H. Jang, S.R. Bae, C.H. An, J.Y. Suh. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:372–378.

Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14(6):835-40.

Poulias E, Greenwell H, Hill M, et al. Ridge preservation comparing socket allograft alone to socket allograft plus facial overlay xenograft: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol.* 2013; 84:1567-1575.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmacologia.* Elsevier, 2012; 7. Ed: 432-440.

Rizzoli R, Adachi JD, Cooper C, Dere W, Devogelaer JP, Diez-Perez A, Kanis JA, Laslop A, Mitlak B, Papapoulos S, Ralston S, Reiter S, Werhja G, Reginster JY. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2012;91(4):225-43.

Ross MH, Pawlina W. *Histologia: texto e atlas- Em correlação com biologia celular e molecular.* Guanabara Koogan, 2012; 6. Ed :224-262.

Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res.* 2011; 20:1–29.

Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-guide). *Biomaterials.* 1997;18: 535-38.

Schmitz JP, Lemke RR, Zardeneta G, Hollinger JO, Milam SB. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a Guidor membrane for guided bone regeneration: case report. *J. oral maxillofac. surg.* 2000;58: 880- 888.

Seidler V, Linetskiy I, Hubáľková H, Stanková H, Smucler R, Mazánek J. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review articles. *Prague Med Rep.* 2008; 109(1):5-13.

Seyhan N, Keskin S, Aktan M, Avunduk MC, Sengelen M, Savaci N. Comparison of the Effect of Platelet-Rich Plasma and Simvastatin on Healing of Critical-Size Calvarial Bone Defects. *J Craniofac Surg.* 2016; 27(5):1367-70.

Sheih A, Han W, Ishii S, Greendale GA, Crandall CJ, Karlamangla AS. Quantifying the balance between total bone formation and total bone resorption: An index of net Bone formation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016.

Sousa LH, Moura EV, Queiroz AL, Val D, Chaves H, Lisboa M, Furlaneto F, Brito GA, Goes P. Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2017; 77:55-61.

Steeve, KT, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15:49-60.

Tsolaki IN, Madianos PN, Vrotsos JA. Outcomes of dental implants in osteoporotic patients. A literature review. *J Prosthodont.* 2009;18(4):309-23.

Valentini P, Abensur DJ. Maxillary Sinus Grafting with Anorganic Bovine Bone: A Clinical Report of Long-term Results. *Int. Journ. Oral Maxillofac Implants*. 2003; 18(4):556-560.

Verna C, Dalstra M, Wikesjö UM, Trombelli L; Bosch C. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol*. 2002; 29(9):865-70.

Von Arx, T., Cochran, D.L., Hermann, J., Schenk, R.K. & Buser, D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and morphometric pilot study in the canine mandible. *Clinical Oral Implants Research*. 2001; 12: 260–269.

Wannmacher L. Manejo racional da osteoporose: onde está o real benefício? *Organização Pan-Americana da Saúde*. 2004;1(7): 1-6.

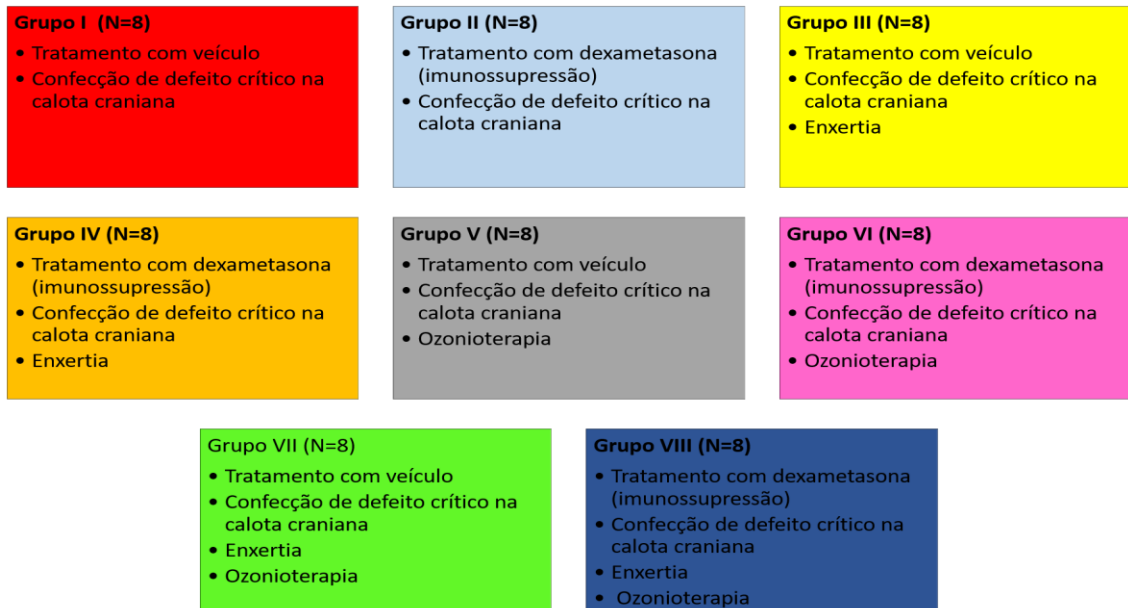
Wardani S, Tjahjanto RT, Somiya I, Robson M, Richard Y, Matsumoto N, Masschelein W, Langlais B, Gordon G, Rakness K. Guideline for Measurement of Ozone Concentration in the Process Gas From an Ozone Generato. *Ozone Science & Engineering*. 1996; 18:209-229.

Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2001; 2, 65-73.

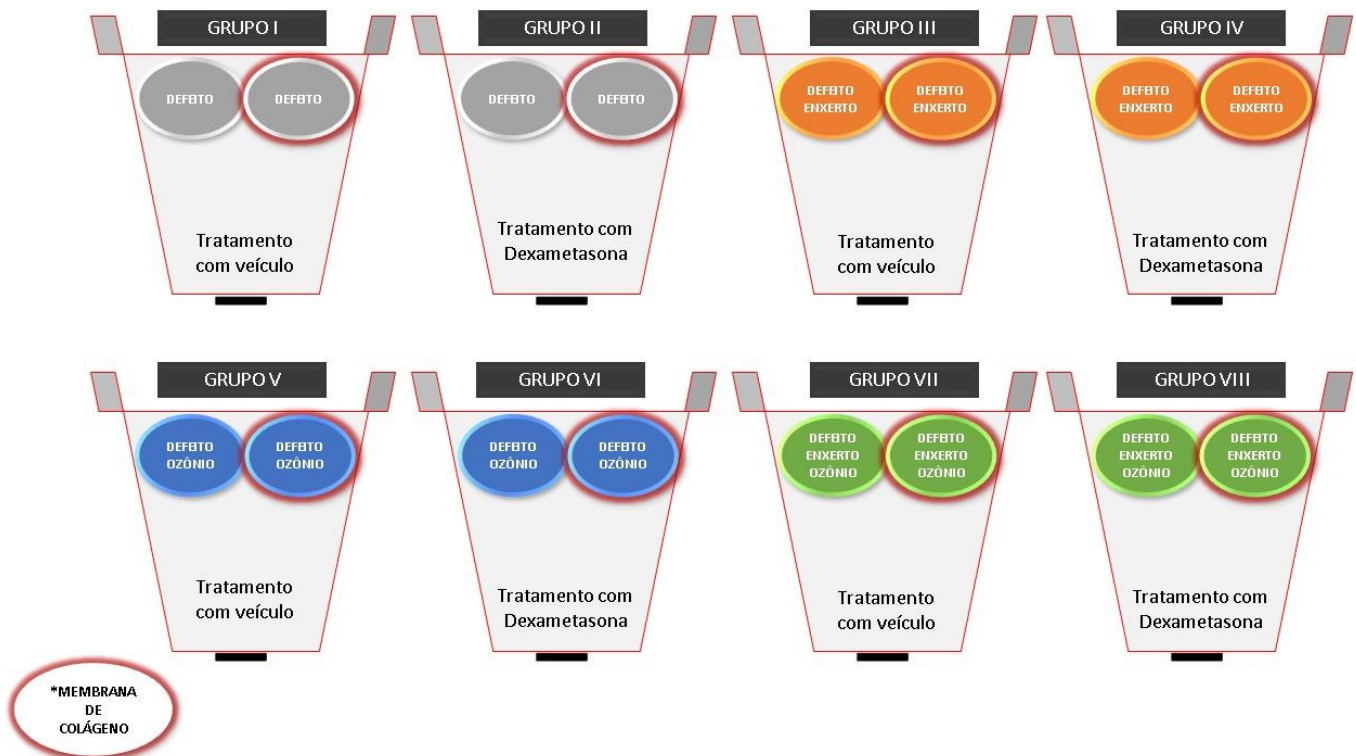
Zellin G, Linde A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg*, v.31, p.97-104, 1997.

Zhao S, Pinholt EM, Madsen JE. Donath K. Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *Journal of CranioMaxillofacial Surgery*. 2000; 28: 116–122

## FIGURAS E IMAGENS



**Figura 1.** Distribuição dos grupos experimentais, de acordo com os procedimentos realizados. N = 8 por grupo; 8 grupos experimentais; N total = 64 animais.



**Figura 2.** Representação esquemática da disposição dos defeitos ósseos na calota craniana de ratos. A marcação em vermelho indica a sobreposição da membrana de colágeno reabsorvível, para fins de comparação do remodelamento ósseo, na ausência da membrana.

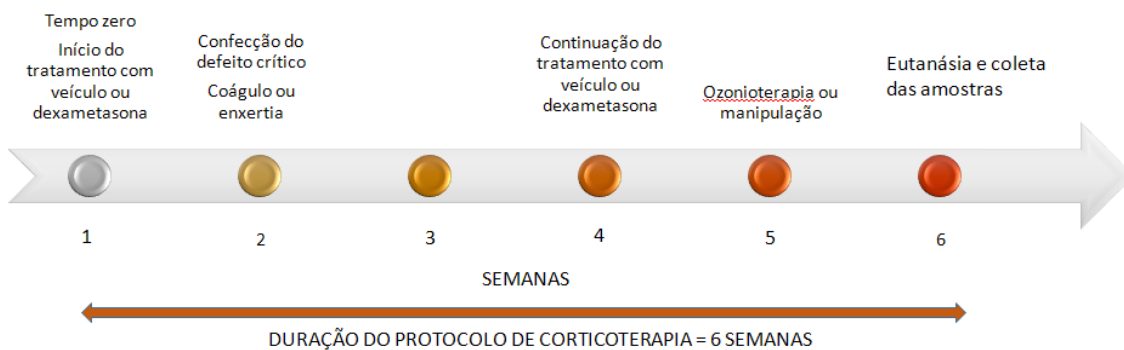
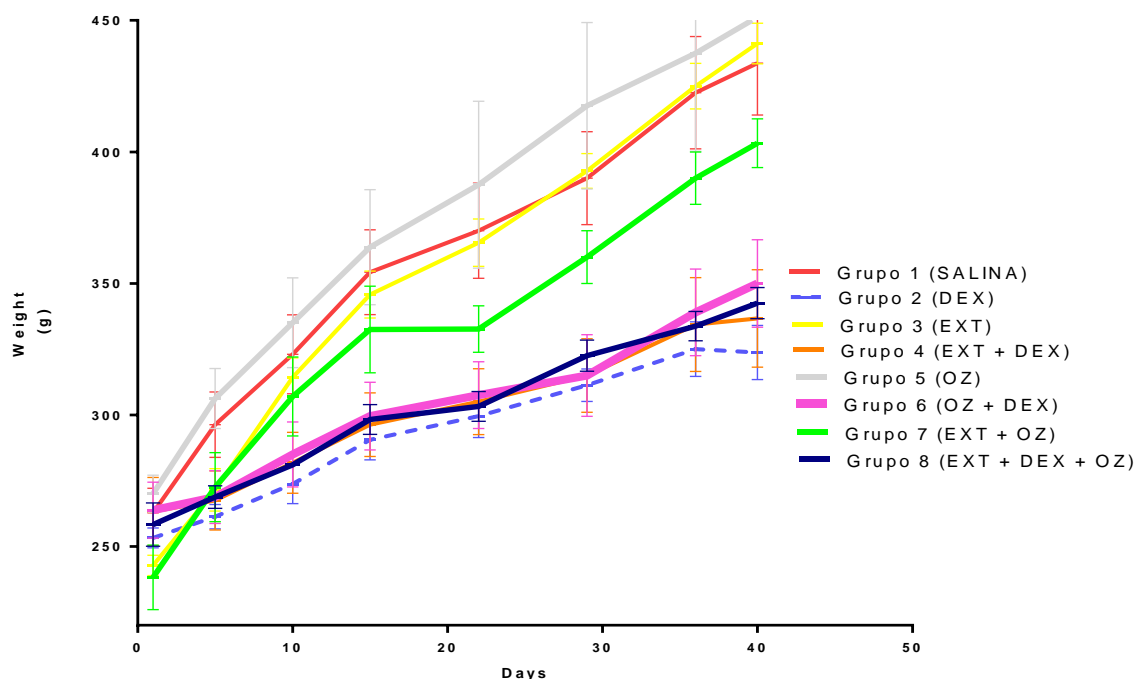


Figura 3. Linha do tempo com os diferentes procedimentos experimentais a serem realizados.

Tabela 1:

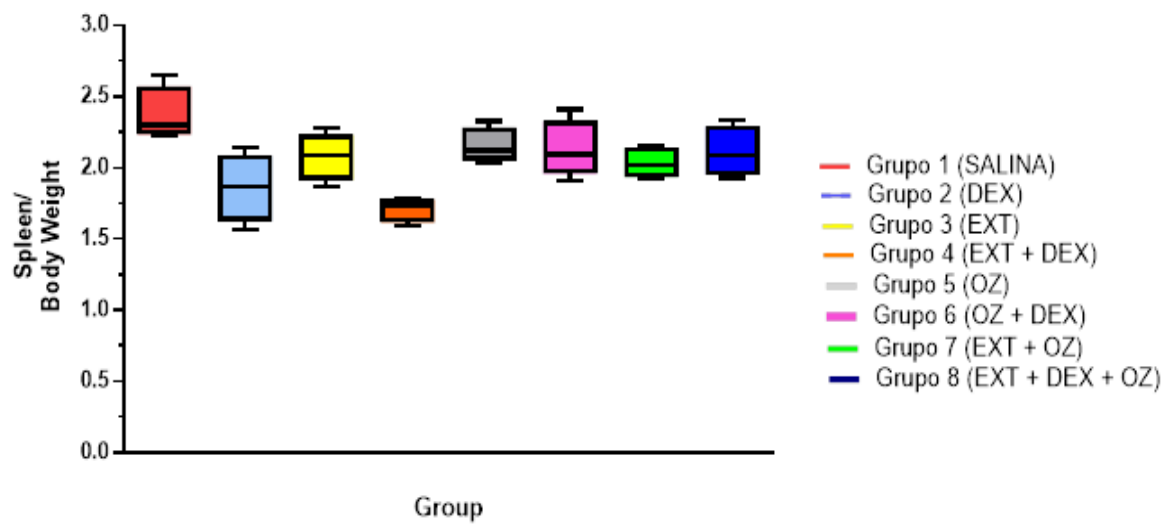


Evolução da média de peso corporal (g) dos grupos experimentais ao longo do tratamento.

\*Estatisticamente significativa às diferenças entre os grupos (ANOVA, seguido do test post Hoc ; P < 0.05).

GRUPOS	Peso animal no final experimento	
	Média	Desvio padrão
Grupo I	433,75	39,45
Grupo II	323,75	20,56
Grupo III	441,25	15,48
Grupo IV	341,75	28,15
Grupo V	451,25	73,75
Grupo VI	350,00	33,42
Grupo VII	417,50	31,22
Grupo VIII	342,50	11,90

Tabela 2:



Varição média do peso do baço (g) dos animais em relação ao peso corporal total (g), nos grupos experimentais.

\*Estatisticamente significativa às diferenças entre os grupos (ANOVA e teste t Tukey;  $P < 0.05$ ).

**Figura 4 A e B:**

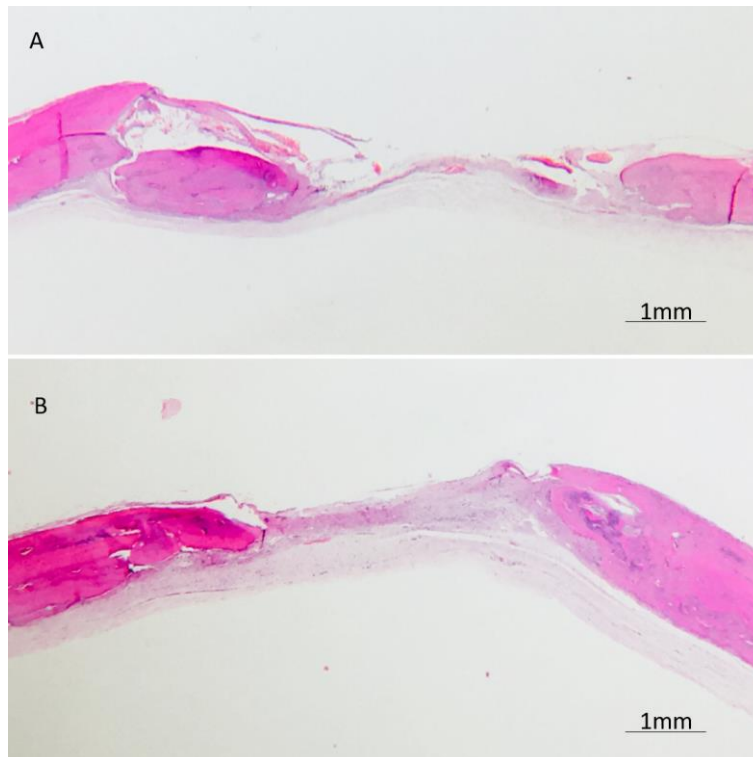
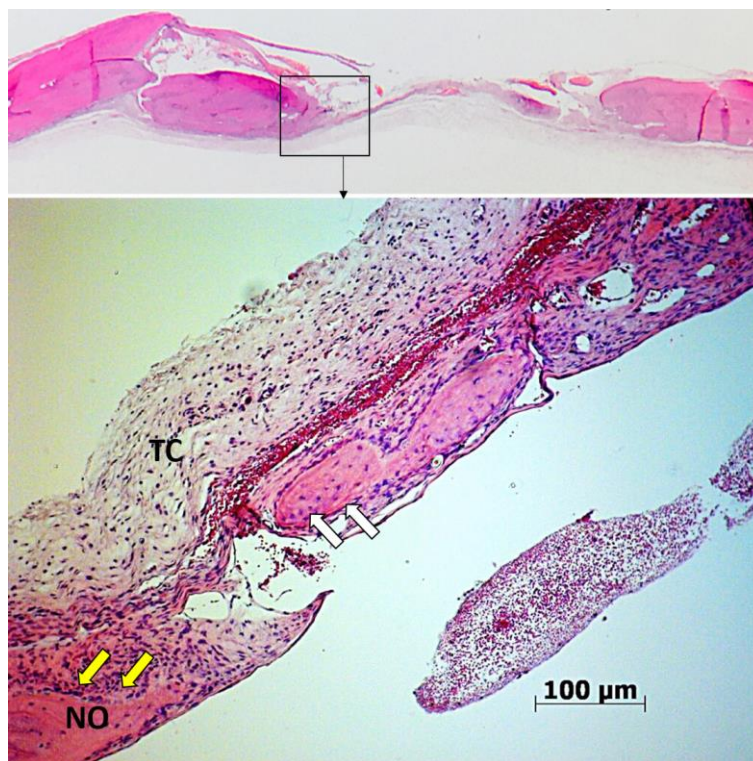


Imagem histológica típica do grupo controle em vista panorâmica (Hematoxilina e Eosina 4x),  
Imagem A: grupo I com membrana de colágeno tipo I (MC). Imagem B: grupo I sem (MC),

**Figura 5:**



Vista panorâmica do defeito do Grupo I (MC), (Hematoxilina e Eosina 4x), Fig. Inferior: vista do centro do defeito ocupado por tecido conjuntivo (TC), novo osso formado (NO) presente nos bordos do defeito cirúrgico. (HE magnificação 10x).



**Figura 6 A e B:**

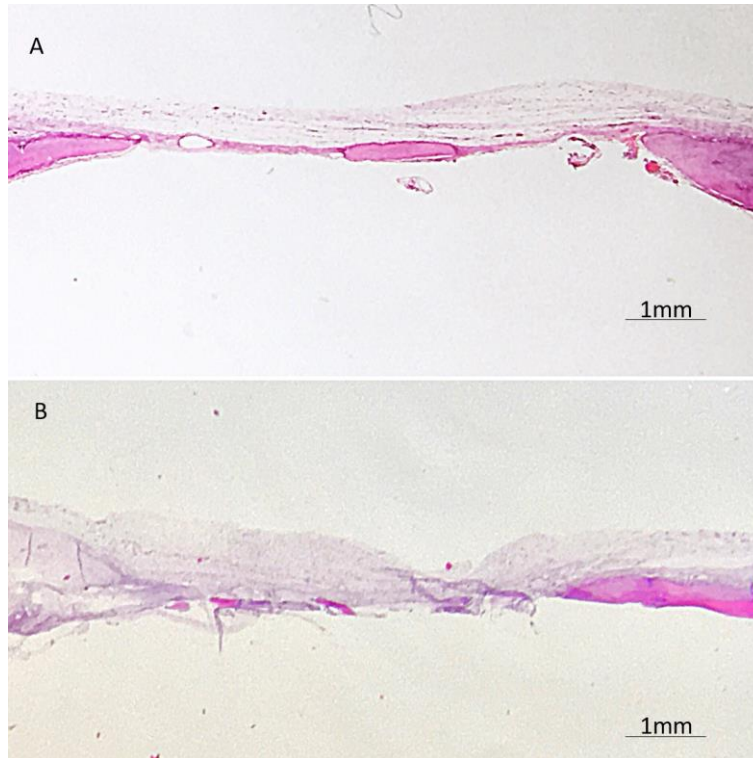
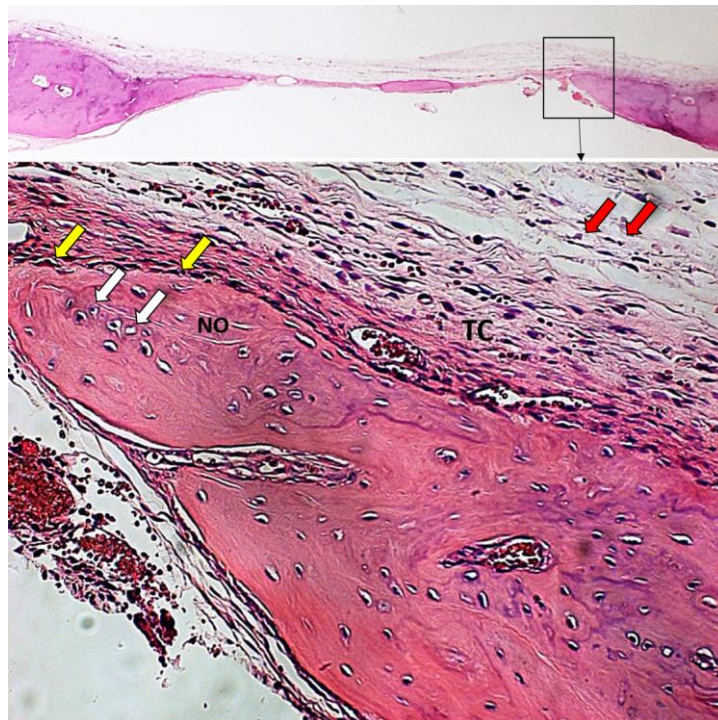


Imagem histológica do Grupo II controle em vista panorâmica (Hematoxilina e Eosina 4x)

Imagem A: grupo II com membrana de colágeno tipo I (MC). Imagem B: grupo I sem (MC), notar a diferença de neoformação óssea devido a presença da MC.

**Figura 7:**



Vista panorâmica do defeito do Grupo II (MC), (Hematoxilina e Eosina 4x), Fig. Inferior: vista do bordo do defeito ocupado por tecido conjuntivo com fibras colágenas orientadas (TC), novo osso formado (NO), seta branca osteócitos, seta amarela osteoblastos. (HE magnificação 10x).



**Figura 8 A e B:**

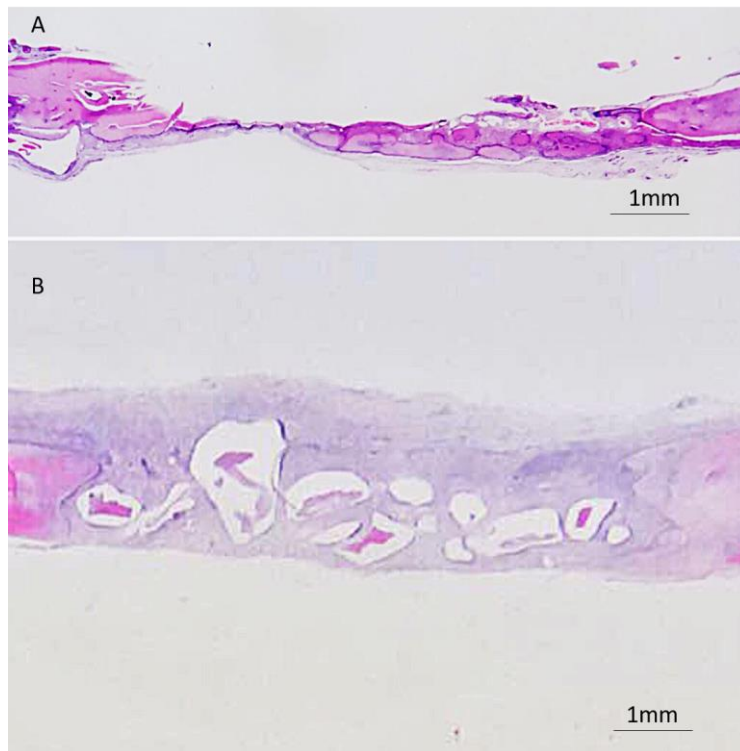
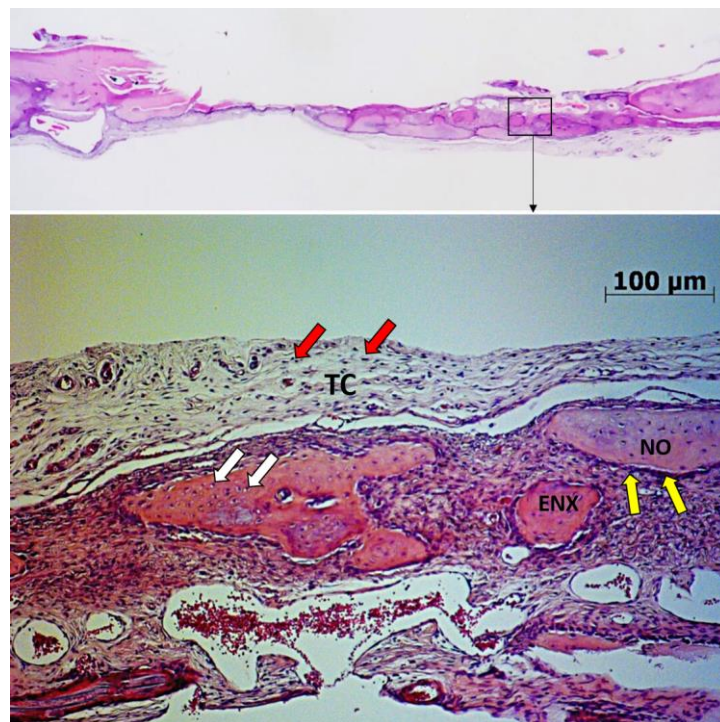


Imagem histológica típica do Grupo III em vista panorâmica (Hematoxilina e Eosina 4x)

Imagem A: grupo III com membrana de colágeno tipo I (MC). Imagem B: grupo I sem (MC), partículas de xenoinxerto encapsuladas por tecido conjuntivo no centro dos defeitos.

**Figura 9:**



Vista panorâmica do defeito do Grupo III (MC), (Hematoxilina e Eosina 4x), Fig. Inferior: vista do centro do defeito ocupado por tecido conjuntivo com fibras colágenas organizadas (TC), novo osso formado (NO), enxerto remanescente (ENX), seta branca osteócitos, seta amarela osteoblastos em grande quantidade nas proximidades da metriz óssea. (HE magnificação 10x).

**Figura 10 e B:**

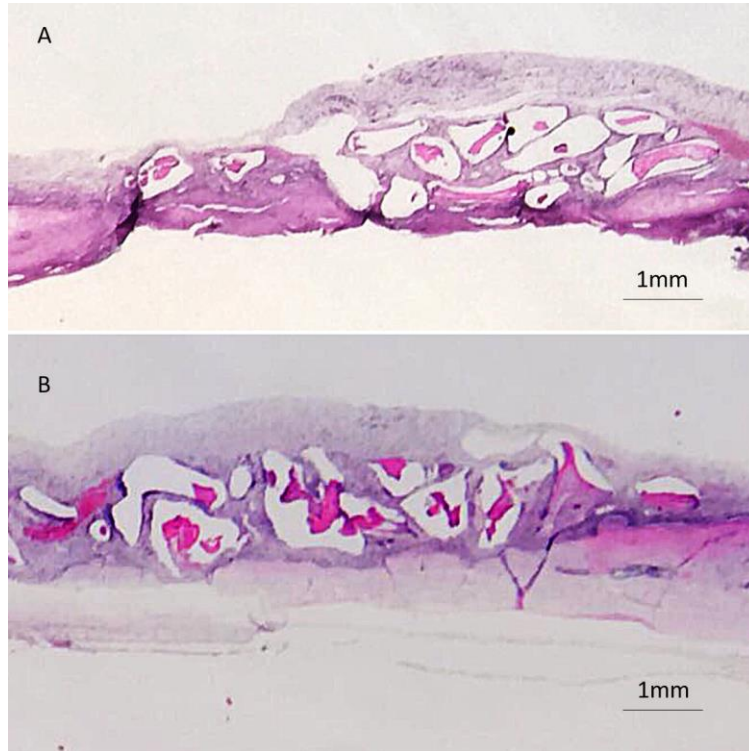
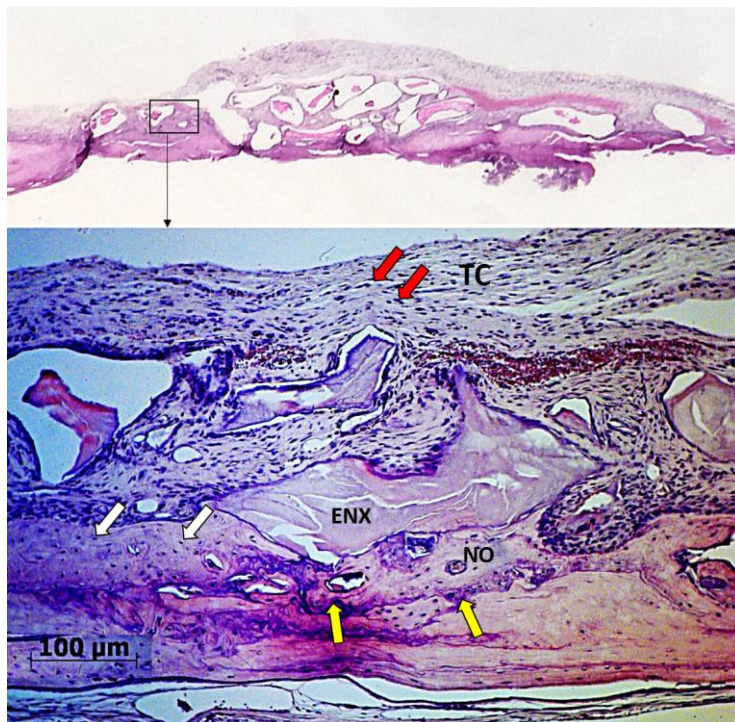


Imagem histológica do Grupo IV, em vista panorâmica (Hematoxilina e Eosina 4x)

Imagem A: grupo IV com membrana de colágeno tipo I (MC). Imagem B: grupo I sem (MC), presença de grande quantidade de enxerto na área superficial do defeito.

**Figura 11:**



Vista panorâmica do defeito do Grupo IV (MC), (Hematoxilina e Eosina 4x), Fig. Inferior: vista da periferia do defeito ocupado por tecido conjuntivo (TC), seta vermelha; células inflamatórias, novo osso formado (NO) presente nos bordos do defeito cirúrgico, seta amarela; osteoblastos, seta branca; osteócitos na matriz óssea. (HE magnificação 10x).



**Figura 12 A e B:**

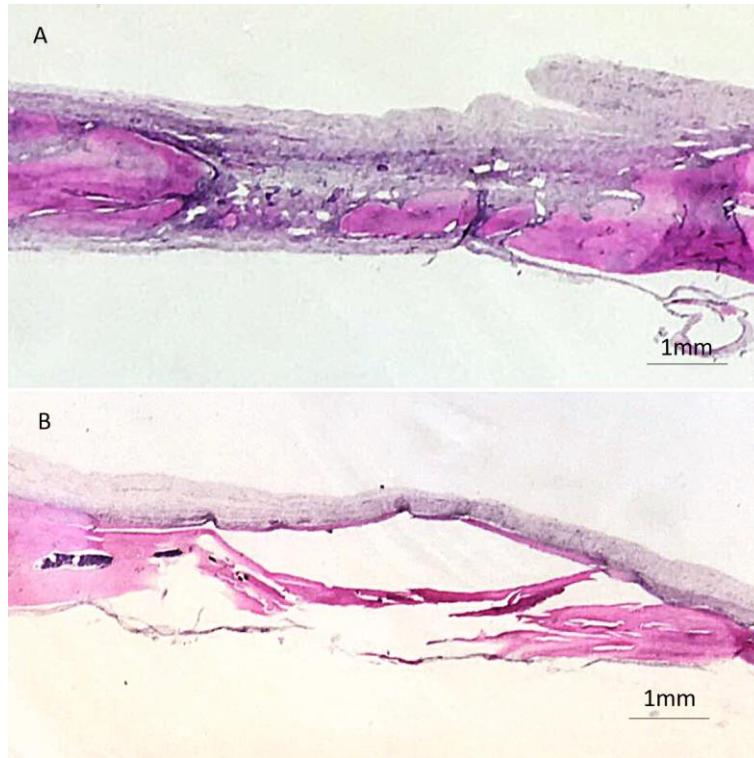
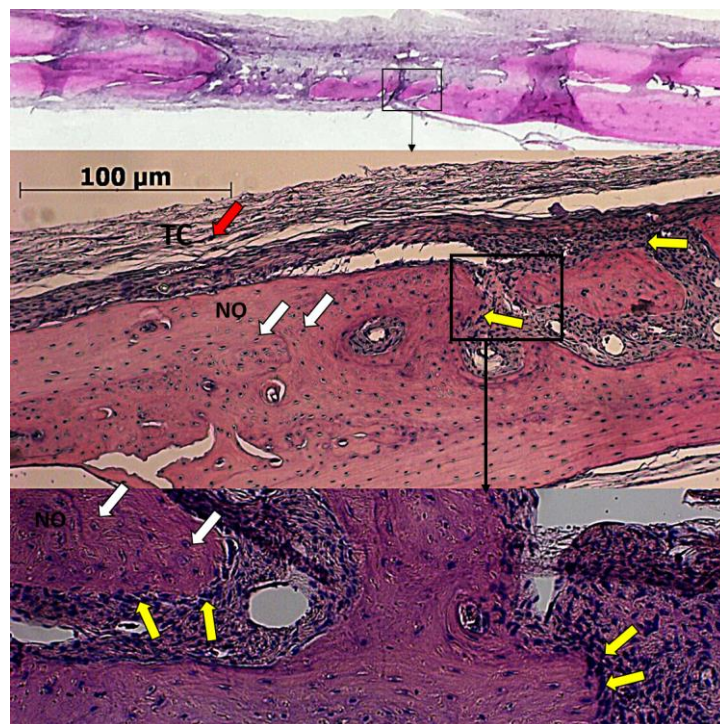


Imagem histológica do grupo V em vista panorâmica (Hematoxilina e Eosina 4x)

Imagem A: grupo I com membrana de colágeno tipo I (MC). Imagem B: grupo I sem (MC), matriz óssea imatura sendo formada nos bordos do defeito.

**Figura 13:**



Vista panorâmica do defeito do grupo V (MC), (Hematoxilina e Eosina 4x), Fig. Inferior: vista da área central do defeito ocupado por tecido conjuntivo (TC), seta vermelha; células inflamatórias, novo osso formado (NO) presente nos bordos do defeito cirúrgico, seta amarela; osteoblastos em atividade aumentada, seta branca; osteócitos na matriz óssea neoformada. (HE magnificação 10x).

**Figura 14 A e B:**

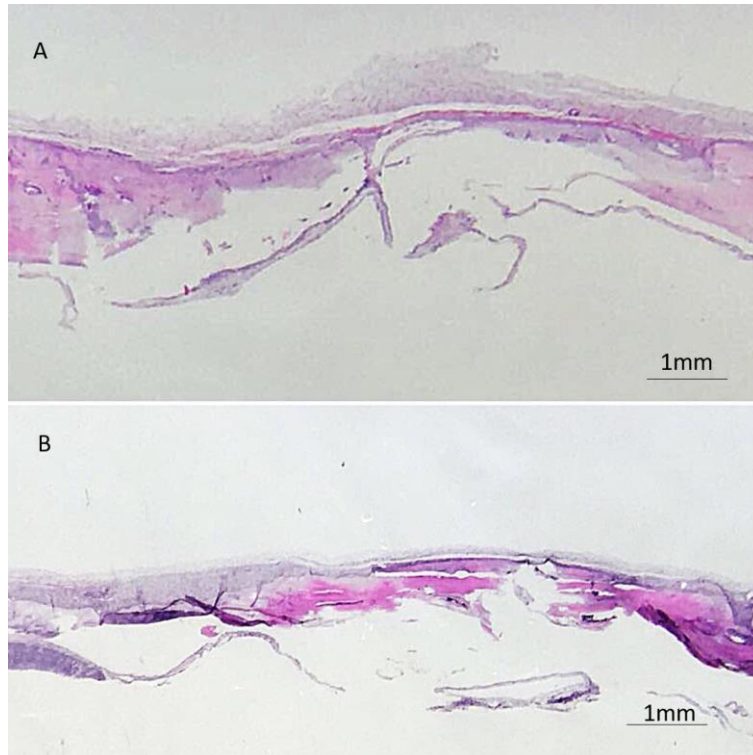
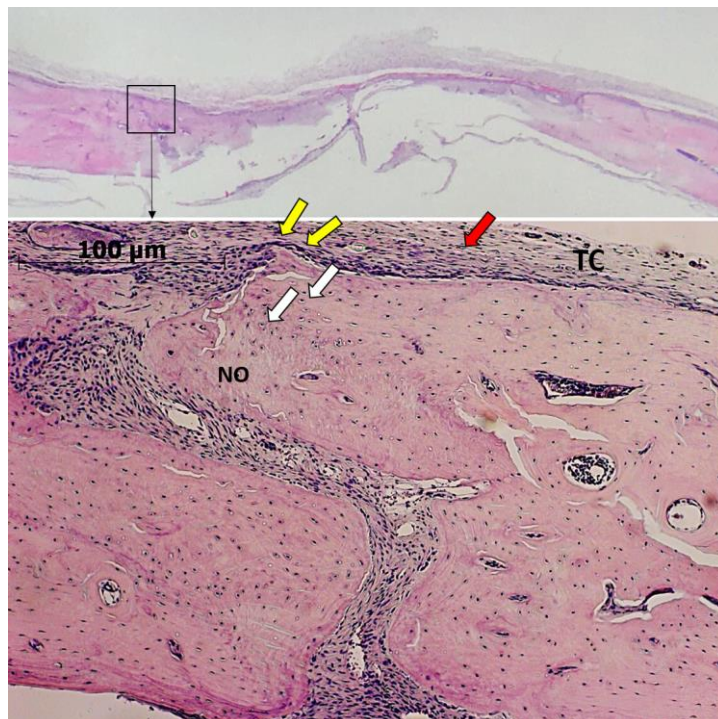


Imagem histológica do Grupo VI em vista panorâmica (Hematoxilina e Eosina 4x)

Imagem A: grupo I com membrana de colágeno tipo I (MC). Imagem B: grupo I sem (MC).

**Figura 15:**



Vista panorâmica do defeito do grupo VI (MC), (Hematoxilina e Eosina 4x), Fig. Inferior: vista do bordo do defeito. tecido conjuntivo (TC), seta vermelha; células inflamatórias, novo osso formado (NO), seta amarela; osteoblastos, seta branca; osteócitos na matriz óssea. (HE magnificação 10x).



**Figura 16 A e B:**

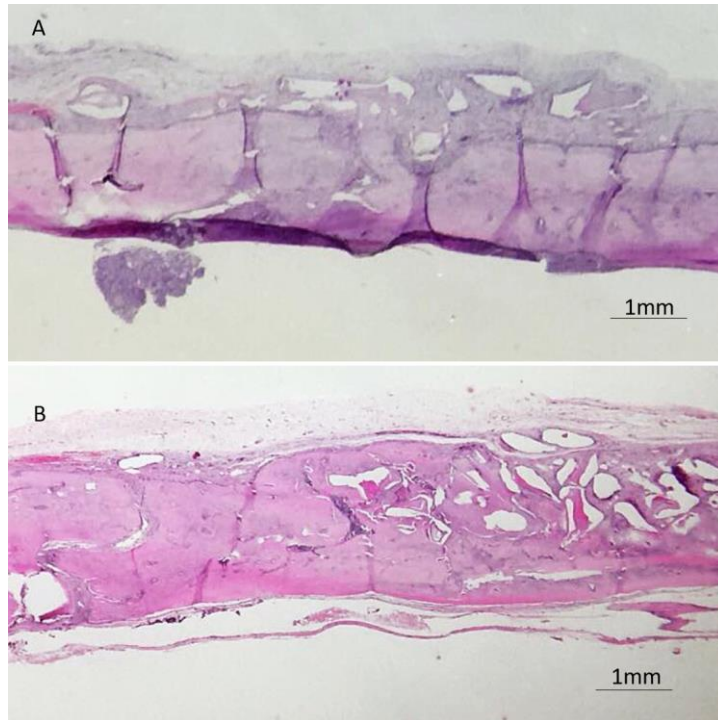
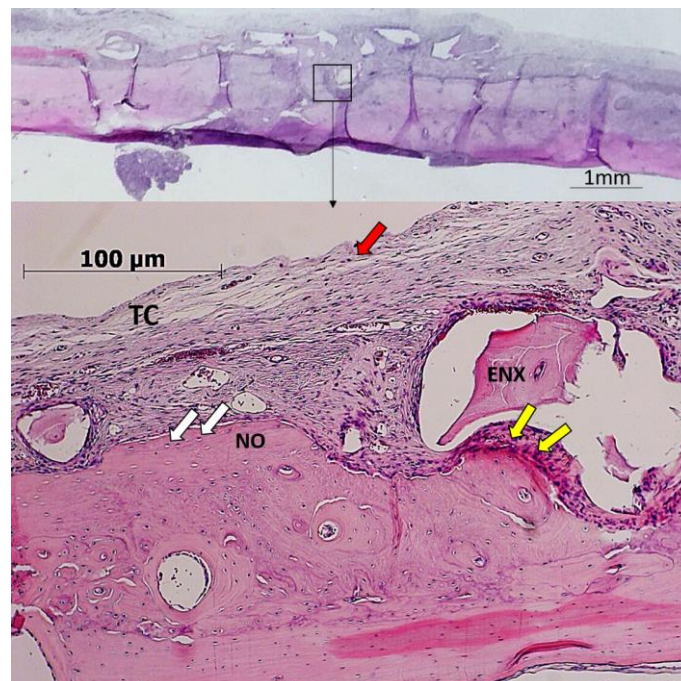


Imagem histológica do Grupo VII em vista panorâmica (Hematoxilina e Eosina 4x)

Imagem A: grupo I com membrana de colágeno tipo I (MC). Imagem B: grupo I sem (MC), grande área de neoformação óssea completando a cicatrização de quase a totalidade da extensão do defeito.

**Figura 17:**



Vista panorâmica do defeito do grupo VII (MC), (Hematoxilina e Eosina 4x), Fig. Inferior: vista do centro do defeito tecido conjuntivo com fibras colágenas orientadas paralelamente (TC), seta vermelha; células inflamatórias, novo osso formado (NO) presente nos bordos do defeito cirúrgico, seta amarela; osteoblastos em torno da matriz óssea, seta branca; osteócitos dispersos na matriz óssea. (HE magnificação 10x).

**Figura 18 A e B:**

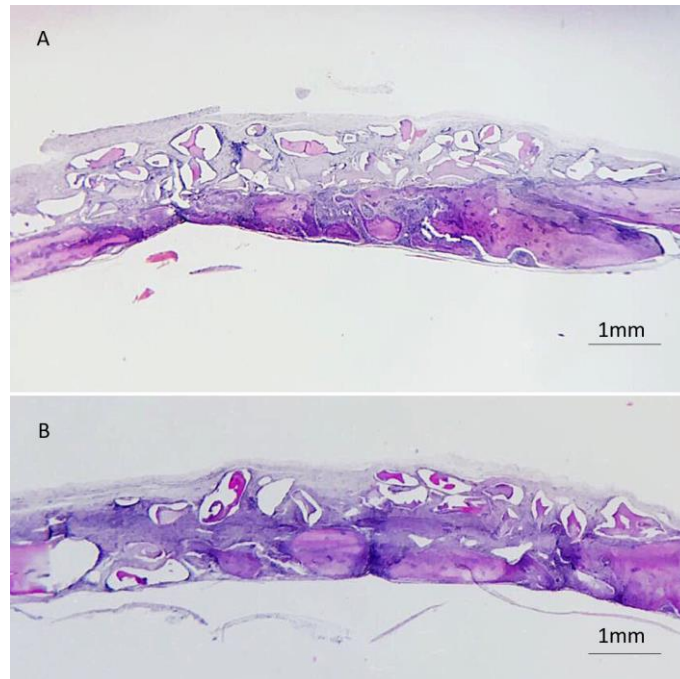
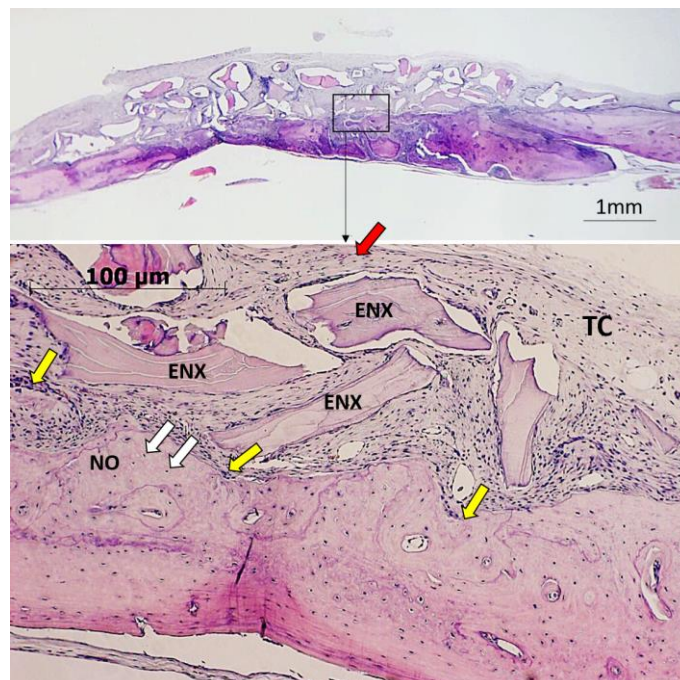


Imagem histológica do Grupo VIII em vista panorâmica (Hematoxilina e Eosina 4x)

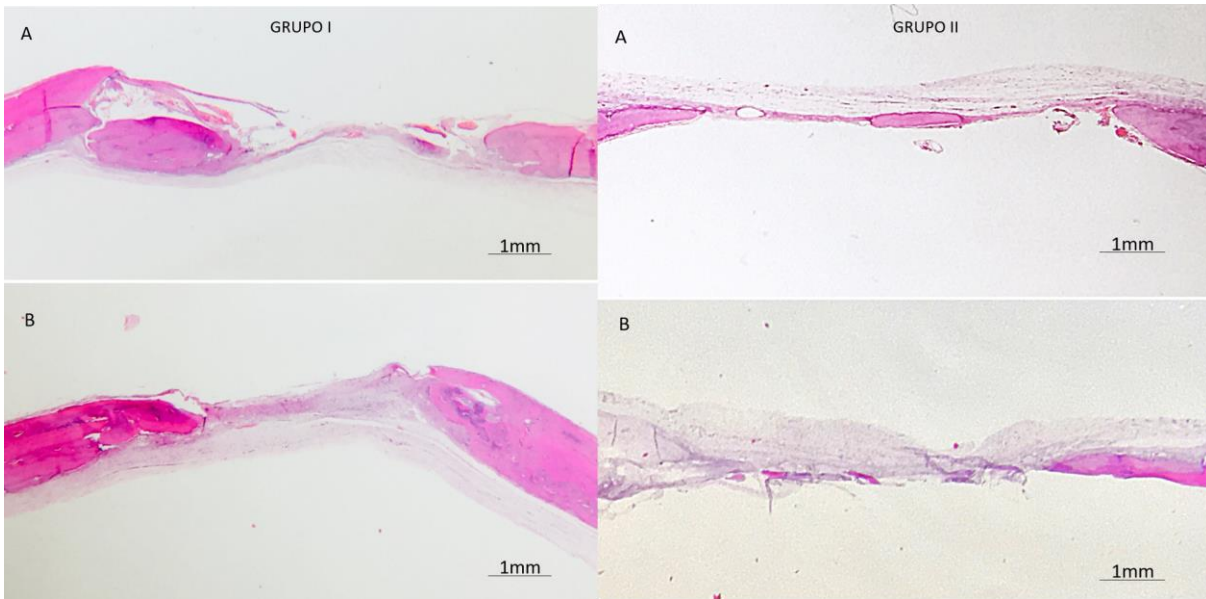
Imagem A: grupo I com membrana de colágeno tipo I (MC). Imagem B: grupo I sem (MC), partículas de enxerto ocupando área central do defeito e viabilizando o recobrindo de quase dois terços do defeito crítico.

**Figura 19:**



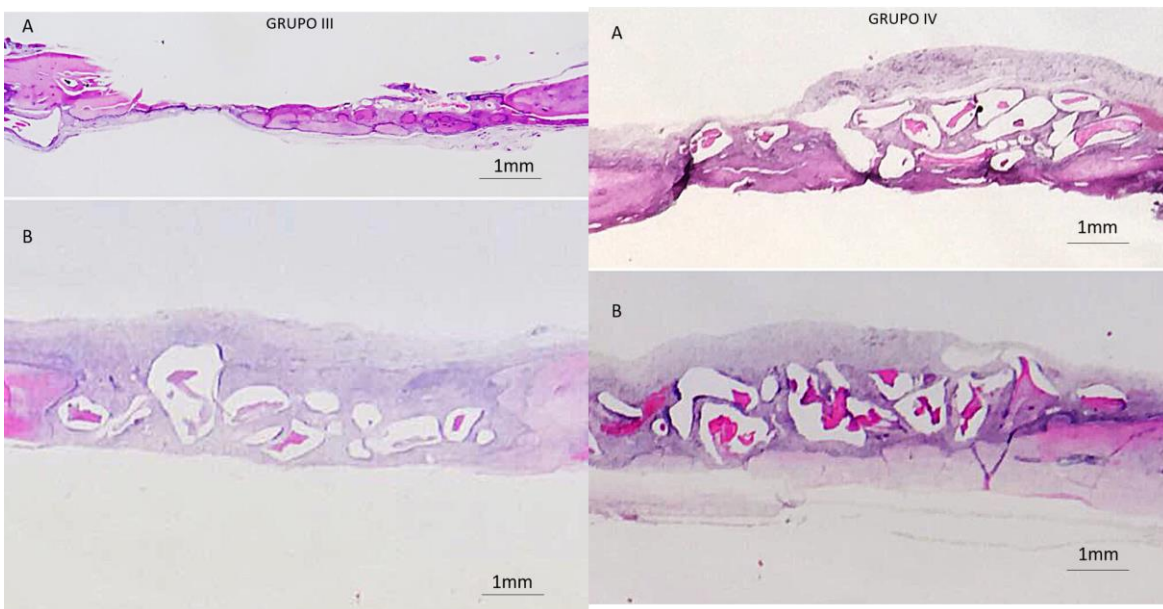
Vista panorâmica do defeito do Grupo VIII (MC), (Hematoxilina e Eosina 4x), Fig. Inferior: vista da área central do defeito ocupado por tecido conjuntivo (TC), seta vermelha; células inflamatórias, novo osso formado (NO), seta amarela; osteoblastos, seta branca; osteócitos na matriz óssea. (HE magnificação 10x).

**Figura 20:**



Vista histológica (Hematoxilina e Eosina em 4x). Imagem comparativa dos Grupos I e II, na qual apenas foram realizados os defeitos para avaliar a influencia da dexametasona (grupo II) em relação ao controle (grupo I). Note que as figuras A, de ambos os grupos esta presente a membrana de colágeno (MC). Cicatrização óssea mais proeminente no grupo I, com ligeiro atraso cicatricial no grupo II.

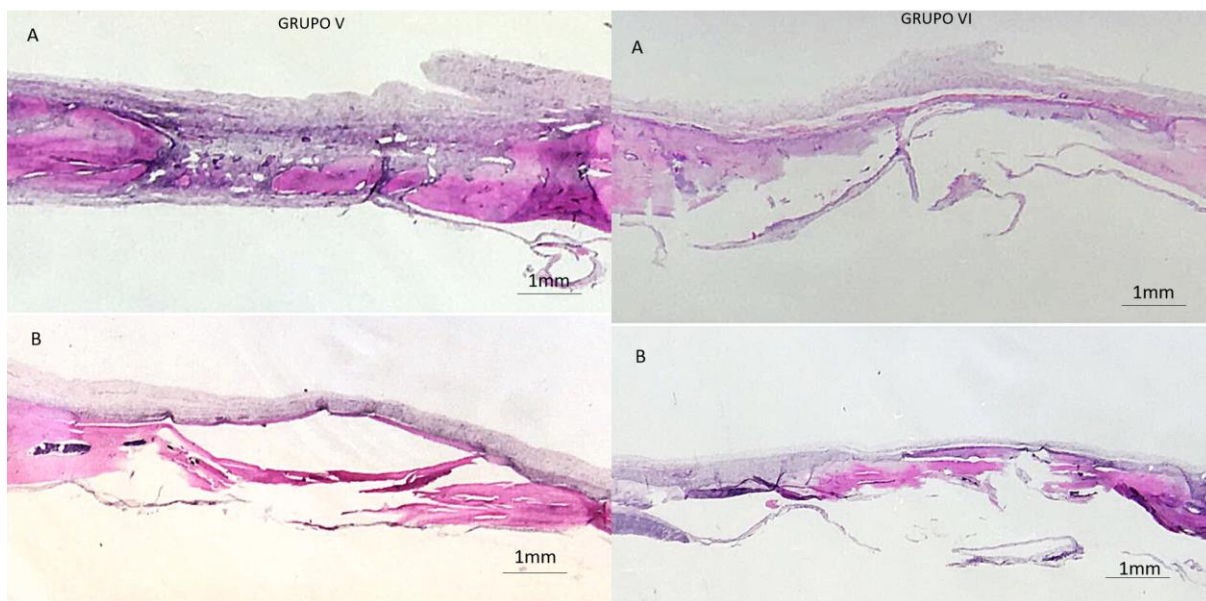
**Figura 21:**



Vista histológica (Hematoxilina e Eosina em 4x). Imagem comparativa dos Grupos III e IV, na qual foram realizados os defeitos e preenchidos com xenoenxerto (Bio-Oss), para avaliar a influência da dexametasona na cicatrização dos enxertos (grupo IV) em relação ao controle (grupo III). Note que as figuras A, de ambos os grupos está presente a membrana de colágeno (MC). Cicatrização óssea mais proeminente no grupo III, com presença de maior ósseointegração do enxerto nos bordos do defeito, o grupo IV mostra que as partículas do enxerto se mantiveram encapsuladas por tecido conjuntivo fibroso.

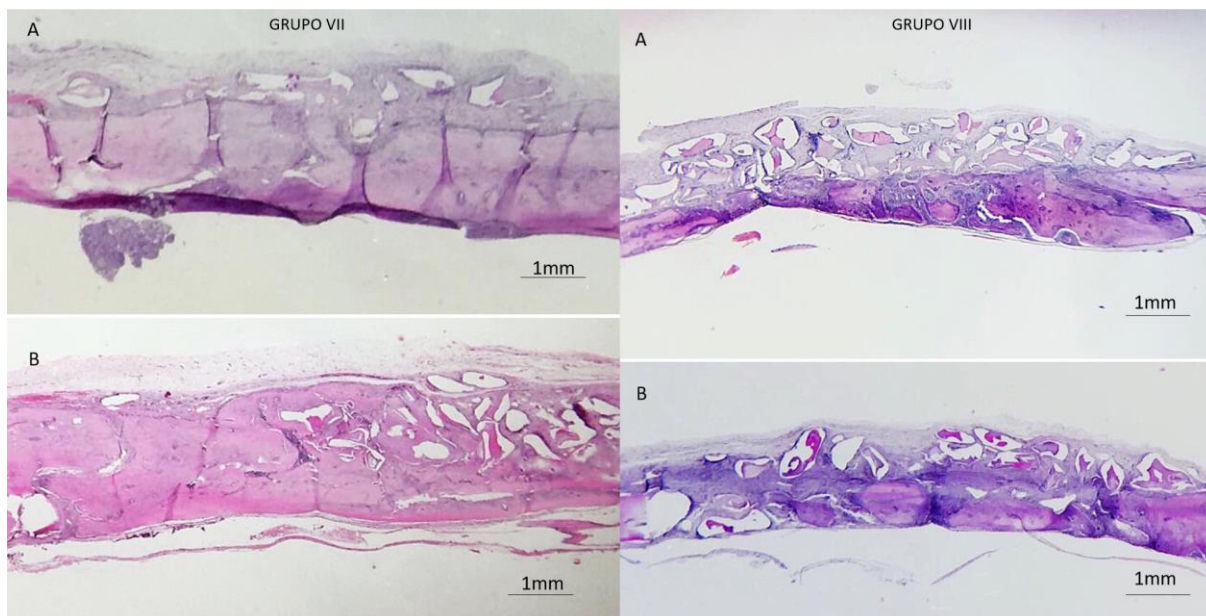


**Figura 22:**



Vista histológica (Hematoxilina e Eosina em 4x). Imagem comparativa dos Grupos V e VI, na qual foram realizados os defeitos críticos e tratamento com ozônio (O<sub>2</sub>), para avaliar a influência da ozônio terapia na cicatrização óssea no perfil osteoporótico desenvolvido pelo glicocorticoide (grupo VI) em relação ao controle (grupo V). Note que as figuras A, de ambos os grupos está presente a membrana de colágeno (MC). Cicatrização óssea mais proeminente no grupo V, com presença de maior neoformação óssea nos bordos do defeito em direção a área central. O grupo VI mostra um leve atraso na cicatrização, por conta da alteração na microarquitetura óssea causada pela dexametasona.

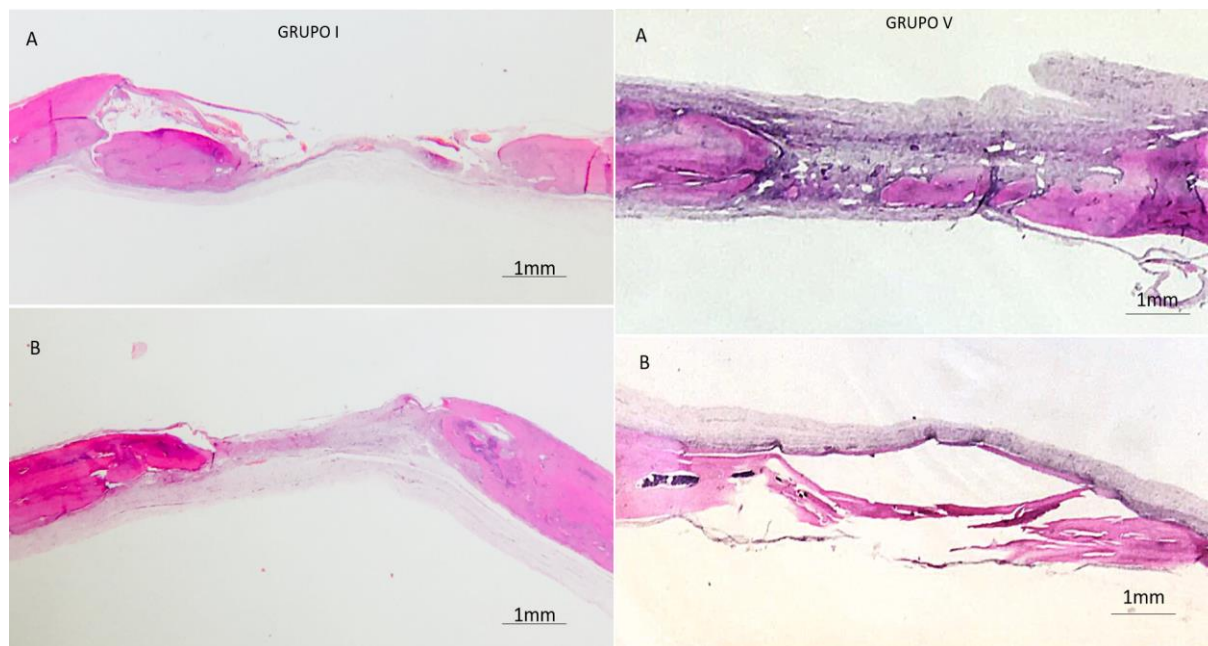
**Figura 23:**



Vista histológica (Hematoxilina e Eosina em 4x). Imagem comparativa dos Grupos VII e VIII, na qual foram realizados os defeitos e preenchidos com xenoenxerto (Bio-Oss), para avaliar a influência da ozônio terapia na cicatrização do enxerto em um modelo de osteoporose induzida por glicocorticóides (grupo VIII) em relação ao controle (grupo III). Note que as figuras A, de ambos os grupos está presente a membrana de colágeno (MC). Cicatrização óssea mais proeminente no grupo VII, com presença de ósseointegração do enxerto em quase toda a extensão do defeito. O grupo VIII mostra que as partículas do enxerto se mantiveram encapsuladas por tecido conjuntivo fibroso na superfície do defeito, e uma menor área de ósseo neoformada em relação ao grupo VII.

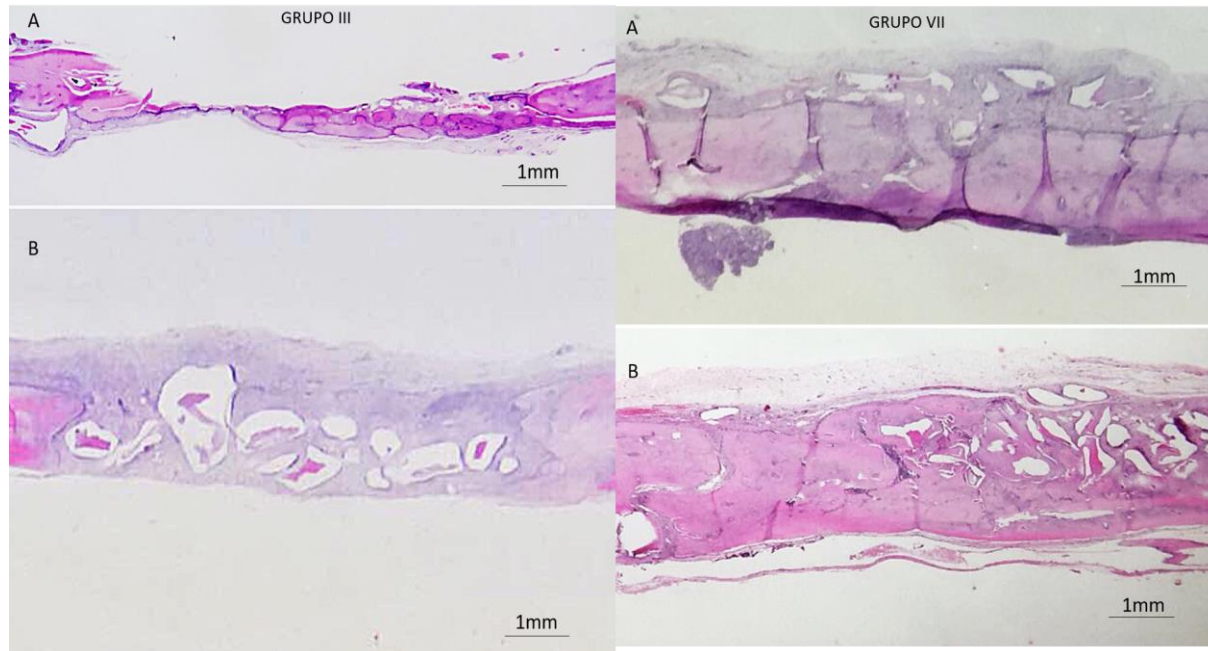


**Figura 24:**



Vista histológica (Hematoxilina e Eosina em 4x). Imagem comparativa dos Grupos I e V, na qual apenas foram criados os defeitos críticos preenchidos por coágulo, porém no grupo V houve a influência positiva da terapia com ozônio, demonstrando através da maior área de osso neoformado ao longo da superfície do defeito. Note que as figuras A, de ambos os grupos está presente a membrana de colágeno (MC).

**Figura 25:**



Vista histológica (Hematoxilina e Eosina em 4x). Imagem comparativa dos Grupos III e VII, na qual foram criados os defeitos críticos preenchidos por xenoenxerto (Bio-Oss), porém no grupo VII a terapia com ozônio possibilitou uma quase fechamento completo de toda a área do defeito, acelerando o processo de cicatrização do enxerto ósseo. Note que as figuras A, de ambos os grupos está presente a membrana de colágeno (MC).

*ANEXO A- Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia-  
PUCRS*



**SIPESQ**  
Sistema de Pesquisas da PUCRS

---

Código SIPESQ: 7891

Porto Alegre, 24 de novembro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA OZONIOTERAPIA, SISTÊMICA SOBRE A REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS EM RATOS SUBMETIDOS À CORTICOTERAPIA". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA

---

ANEXO B- Carta de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais- PUCRS



**SIPESQ**  
Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7691

Porto Alegre, 9 de dezembro de 2016

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA OZONIOTERAPIA SISTÊMICA SOBRE A REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS EM RATOS SUBMETIDOS À CORTICOTERAPIA" coordenado por MARIA MARTHA CAMPOS.

Sua Investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta Investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 09/12/2016 - 09/12/2017

Nº de Animais	Espécie
78	Rattus norvegicus
Total de Animais: 78	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

---

*ANEXO C- Comprovante de trabalho científico publicado*

De: [em.scs.0.52ea05.505fbfb6@editorialmanager.com](mailto:em.scs.0.52ea05.505fbfb6@editorialmanager.com) <[em.scs.0.52ea05.505fbfb6@editorialmanager.com](mailto:em.scs.0.52ea05.505fbfb6@editorialmanager.com)> em nome de Journal of Craniofacial Surgery <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>

Enviado: terça-feira, 2 de maio de 2017 01:50

Para: Ricardo Augusto Conci

Assunto: SCS Decision SCS-17-0574

CC: [mbhabal@verizon.net](mailto:mbhabal@verizon.net)

May 01, 2017

RE: SCS-17-0574, entitled "Giant peripheral temporomandibular osteoma with immediate reconstruction of mandible"

Dear Mr. Conci,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in Journal of Craniofacial Surgery. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

#### OPEN ACCESS

If you indicated in the revision stage that you would like your submission, if accepted, to be made open access, please go directly to step 2. If you have not yet indicated that you would like your accepted article to be open access, please follow the steps below to complete the process:

1. Notify the journal office via email that you would like this article to be available open access. Please send your email to [jcraniofacialsurgery@gmail.com](mailto:jcraniofacialsurgery@gmail.com). Please include your article title and manuscript number.

2. A License to Publish (LTP) form must be completed for your submission to be made available open access. Please download the form from <http://links.lww.com/LWW-ES/A49>, sign it, and Email the completed form to the journal office.

3. Within 48 hours of receiving this e-mail: Go to <http://wolterskluwer.gconnect.com> to pay for open access. You will be asked for the following information. Please enter exactly as shown:

a. Article Title - Giant peripheral temporomandibular osteoma with immediate reconstruction of mandible

b. Manuscript Number - SCS-17-0574

**\*\*Open Access is a choice. All papers are processed for standard publication unless you notify the journal office differently. For this reason, there is no need to contact the journal office if you do not wish you paper to be Open Access\*\***

Thank you for submitting your interesting and important work to the journal.

<http://scs.edmgr.com/>

Your username is: [ricardo\\_conci@hotmail.com](mailto:ricardo_conci@hotmail.com)

Your password is: [available at this link](#)

With Kind Regards,

Mutaz B. Habal, M.D.

Editor-in-Chief

Journal of Craniofacial Surgery



BRIEF CLINICAL STUDIES

# Giant Peripheral Temporomandibular Osteoma With Immediate Reconstruction of Mandible

AQ1 *Cláudio Haib, BDS, MSc, PhD,\* Ricardo Augusto Conci, BDS, MSc, PhD,<sup>†</sup> Flávio Henrique Silveira Tomazi, BDS, MSc, PhD,<sup>‡</sup> Guilherme Pivato Louzaki, BDS,\* Michel Martins Guarenti, BDS, MSc,<sup>§</sup> and Guilherme Genehr Frischer, BDS, MSc, PhD<sup>¶</sup>*

**Abstract:** Osteoma is a benign osteogenic tumor, which is characterized by the slow-growing proliferation of compact or cancellous bone. The etiology of the lesion is not well established. Among the hypotheses, the following are related: a traumatic factor, infectious processes, or true neoplasm due to the origin of cartilaginous cells. It can present at any age, usually in young adult individuals, with equal prevalence in both sexes. The clinical characteristics of the peripheral osteoma are represented by slow asymptomatic growth, which leads to swelling and, thus, facial asymmetry. When it is related to the mandibular condyle, this growth can cause functional impairment, such as malocclusion, temporomandibular joint dysfunction, and even limited mouth-opening owing to ankylosis.

**Key Words:** Osteoma, osteogenic tumor, temporomandibular joint

Osteoma is a benign osteogenic tumor, which is characterized by the slow-growing proliferation of compact or cancellous bone.<sup>1</sup> The etiology of the lesion is not well established. Among the hypotheses, the following are related: a traumatic factor, infectious processes, or true neoplasm due to the origin of cartilaginous cells.<sup>2,3</sup> It can present at any age, usually in young adult individuals, with equal prevalence in both sexes.<sup>4</sup> The clinical characteristics of the peripheral osteoma are represented by slow asymptomatic growth, which leads to swelling and, thus, facial asymmetry.<sup>5</sup> When it is related to the mandibular condyle, this growth can cause functional impairment, such as malocclusion, temporomandibular joint (TMJ) dysfunction, and even limited mouth-opening owing to ankylosis.<sup>6</sup>

This paper will report a patient with a giant peripheral osteoma located in the temporomandibular region, which was treated with tumor resection and immediate reconstruction with a reconstruction plate, with the condyle being built with surgical cement.

## CLINICAL REPORT

A 49-year-old leukodermatous female patient presented with great swelling of the right hemi-face in the temporomandibular region,



FIGURE 1. (Top left) Clinical presentation of the patient; (top right) 3-dimensional model showing extent of lesion involving the temporomandibular region; (bottom left and right) coronal and axial section of computed tomography scan showing a giant bone mass in the temporal region, which also affected the temporomandibular joint.

which was hard yet painless at palpation, with a 2-year evolution period. In the anamnesis, the etiologic cause of the lesion was not determined. Limited mouth-opening with a maximum amplitude of 10 mm was observed. A computed tomography (CT) scan and a 3-dimensional model showed a well-defined circumscribed lesion, of x-y-z mm of extension, involving a broad temporal area extending from the zygomatic arch of the zygomatic bone, in the petrous portion of the temporal bone, to the mandible. The condyle and the mandibular ascending ramus were also involved (Fig. 1).

The surgical plan was based on the assessment of a CT angiography and selective laser sintering model, in which the extension and the limits of the lesion were ascertained, along with the proximity of the blood vessels that were on the borders of the tumorous bone mass (Fig. 2).

Two surgical approaches were used to expose the tumor: a presauricular incision with temporal extension in addition to the

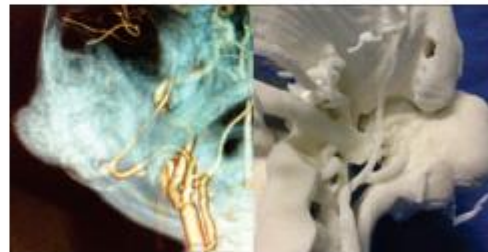


FIGURE 2. (Left and right) Three-dimensional computed tomography angiography and selective laser sintering model showed the proximity of the blood vessels to the lesion and the mandibular condyle involved in the bone mass of the temporal region.

AQ3 From the \*Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; †Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR; and ‡Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil. Received April 3, 2017.

AQ4 Address correspondence and reprint requests to Ricardo Augusto Conci, BDS, MSc, PhD, Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário, Zip Code 85819-110, Cascavel, PR, Brazil; E-mail: ricardo\_conci@hotmail.com.

The authors report no conflicts of interest. Copyright © 2017 by Mutaz B. Habal, MD ISSN: 1049-2275 DOI: 10.1097/SCS.0000000000000970





FIGURE 3. (Left) Slice osteotomies for the removal of the tumor; (right) 2.4-mm reconstruction plate and condyle made of radiopaque bone cement; and myofascial strip from the temporal muscle.

submandibular incision. The surgery was conducted in 4 stages, the first being the removal of the lesion through the preauricular access and desiccating the temporozygomatic bone portion, and the second, that of the mandibular portion through the submandibular access, both of which used slice osteotomies to facilitate the removal of bone portions. The third stage was piezosurgery, in which a new glenoid cavity was built along with the removal of the most medial portion of the lesion. Finally, a myofascial strip pad of the temporal muscle was obtained and positioned in the glenoid cavity to protect the temporal bone, and a condyle was made with radiopaque bone cement and fixed on the tip of the 2.4-mm mandibular reconstruction plate. Immediate reconstruction of the mandible and of the TMJ was thus possible, affording the reestablishment of the patient's mastication function (Fig. 3).

Histopathologic examination (Fig. 4) showed a compact trabecular bone, with the presence of a small number of marrow elements, associated with a hardened nodule in its central portion, confirming, therefore, the diagnosis of peripheral osteoma.

At 6-month follow-up (Fig. 5), the patient displayed slight facial asymmetry with a good mouth-opening and stable occlusion. The mastication function was reestablished, with no limitations or facial pain. Maximum incisal mouth-opening was 40 mm, although the lateral movements were limited. No signs of recurrence were observed. Also, a good positioning of the reconstruction plate was verified in relation to the new articulation.

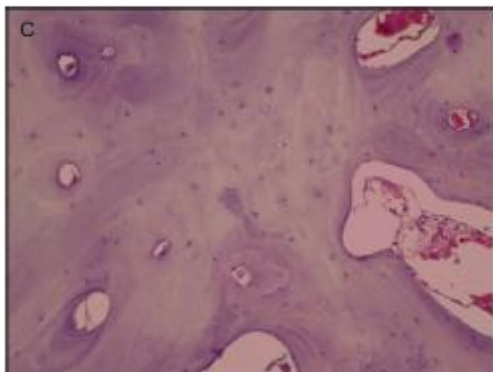


FIGURE 4. Histopathologic examination showed a compact trabecular bone, with the presence of a small number of marrow elements, associated with a hardened nodule in its central portion, confirming, therefore, the diagnosis of peripheral osteoma (x200).

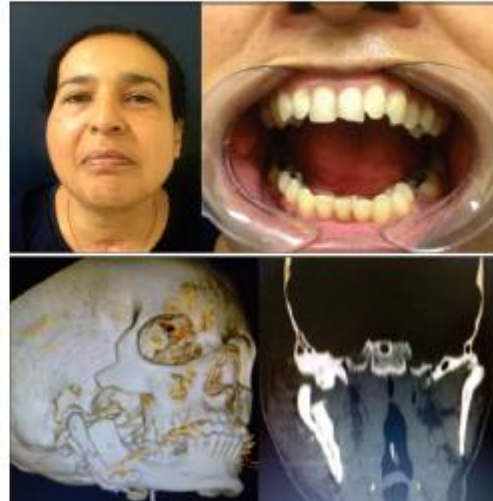


FIGURE 5. (Top left) At 6 months postoperatively showing patient without deformity; (top right) clinical picture shows maximum incisal mouth-opening of 40 mm. (Bottom left) Postoperative 3-dimensional model shows reconstruction plate, with the mandibular condyle in the glenoid cavity having been surgically built previously; (bottom right) computed tomography scan shows no sign of recurrence.

DISCUSSION

Since osteoma is a bone pathology that is found solely in the bones of the skull, peripheral osteoma is an uncommon manifestation of this lesion in the maxillary bones.<sup>7</sup> The pathogenesis of peripheral osteoma is not as yet clear. Neville et al<sup>7</sup> regard condylar osteomas as true neoplasias, while other authors characterize the lesion as a hyperostosis or a development abnormality caused by infectious processes and trauma.<sup>7</sup> Nevertheless, Kerckhaert et al<sup>8</sup> reinforce the theory that this entity is characterized as a benign neoplastic lesion, owing to its slow and continuous growth throughout time. Kaplan et al<sup>7</sup> in their review suggest that the probable etiology of the lesion is related to trauma. In the present patient, no previous history of trauma or infectious process was associated, and, thus, information was not enough to determine the possible cause of the lesion.

The most common location of a peripheral osteoma is in the paranasal sinuses, the frontal sinus being the most affected followed by the ethmoid and the maxillary sinuses.<sup>7,9</sup> Other skull bone structures, such as temporal bones and the pterygoid process are also described. The maxillary bones have a low incidence of occurrence.<sup>6,7</sup> Osteomas can arise in the marrow portion of the bone—the so-called central or endosteal osteomas—or on the bone surface, with a sessile aspect—in this patient peripheral osteomas. Extraskeletal locations, in soft tissues, can also be found in muscles, for example—the so-called cutaneous osteomas.<sup>2,6</sup> In the mandible, the most common location is in the lingual portion, in the lower border, and in the mandibular ascending ramus.<sup>7</sup> In 1927, Ivy<sup>10</sup> reported the first patient with osteoma involving the condylar process. Since then, only 20 patients with condylar peripheral osteoma were reported in the literature. The slow growth of a peripheral osteoma can be clinically assessed with x-ray follow-ups, since the swelling is asymptomatic. However, when spread over large portions, it gives rise to expressive facial deformities, occlusion alterations, midline deviations, and even limited mouth-opening caused by articular ankylosis.<sup>6,8</sup> In the present patient, one

could notice strong facial asymmetry caused by swelling by a giant peripheral osteoma located in the right condylar process. In the clinical examination, the patient's main complaint consisted in decreased mouth-opening, caused by the articular ankylosis brought about by the lesion.

According to Yonezu et al,<sup>11</sup> osteomas occurring in the condylar process can be classified into 2 types: those that proliferate and cause reabsorption and replacement of the condyle by the osteoma; and those that originate as a proliferating bone mass, whether pedunculated or sessile, in the bone surface of the mandibular condyle.<sup>11,15</sup> In the patient described, we could identify the presence of an extensive area of uniform compact bone, of well-defined radiopacity, starting from the temporozygomatic region up to the mandible, leading to the replacement of the mandibular condyle by pathological bone tissue, which could be confirmed by CT scans.

The differential diagnosis of this lesion includes other bone pathologies, such as exostoses, osteoblastoma, osteoid osteoma, fibrous dysplasia, central ossifying fibroma, complex odontoma, cementoblastoma, and condensing osteitis.<sup>3,13</sup> The presence of multiple osteomas should be called to attention for the diagnosis of Gardner syndrome. It is necessary to assess the possible presence of skeletal abnormalities, presence of supernumerary teeth, and colorectal polyps in order to confirm the diagnosis.<sup>6</sup> Osteoid osteomas and osteoblastomas share highly vascular characteristics with the presence of osteoid tissue and are more frequently painful and grow more rapidly than peripheral osteomas.<sup>13</sup> Exostoses are hamartomas, with a predilection for the lingual portion of the mandible and the midline of the hard palate in the alveolar bone. They have limited growth, differently from osteomas.<sup>14</sup> Central ossifying fibromas present with thin and well-defined borders, separated by a radiolucent rim that surrounds the bone of sclerotic borders. Complex odontomas present as a highly dense endosteal radiopaque mass.<sup>4,14</sup>

Histologically, osteomas can be divided into compact or "ivory" osteomas, with the appearance of a dense bone with minimal marrow spaces and occasional Haversian canals, and spongio-osteomas, which are similar in appearance to the original bone, with the presence of osteal trabeculae, marrow, and osteoblasts.<sup>2,3</sup> Larrea-Oyarbide et al<sup>15</sup> in their review of patients found that compact osteomas have a greater incidence of occurrence. In the present patient, electronic microscopy showed the presence of a spongio-osteoma.

The treatment of this pathology will be determined according to a suite of imaging analyses collected in the clinical examination to determine the extension of the lesion and the possible complications for the patient.<sup>3</sup> In general, extensive lesions that lead to functional impairment and TMJ dysfunctions, as well as ankylosis that limits mouth-opening, followed by face asymmetry, malocclusion and pain will be indications for the surgical excision of the lesion.<sup>4,15</sup> The surgical treatment is not recommended in asymptomatic lesions, which do not cause functional impairment for the patient. Should the surgical treatment be indicated, the objective will be that of the conservative removal of the lesion, which will not harm important adjacent structures.<sup>4,13</sup> Herford et al<sup>6</sup> in their review of

the literature pointed out the indication of the procedure of condylectomy in 10 out of 18 patients with peripheral osteoma located in the condyle, since the first patient reported in 1927.<sup>6,10</sup> Shetty and Biddappa<sup>16</sup> reported a patient with recurrence of a peripheral osteoma in the mandible after a 8-year evolution and chose a surgical removal and immediate reconstruction with an autogenous graft harvested from the iliac crest and fixation with a long 2.5-mm reconstruction "L" plate. The treatment of choice in the present patient was the total removal of the tumor, since it prevented the maintenance of the TMJ functions due to ankylosis. Immediate reconstruction of the mandibular condyle on a reconstruction plate was proposed to afford the maintenance of the mastication function.

A long-term clinical and radiographic follow-up of patients who undergo a surgical treatment of the removal of an osteoma is necessary. However, recurrences of the lesion have not been observed to date.<sup>8,15</sup>

## REFERENCES

- Mancini JC, Woltmann M, Felix VB, et al. Peripheral osteoma of the mandibular condyle. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34:92-93
- Neville BW, Damm DD, Allen CM, et al. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2009
- Boffano P, Rocca F, Campisi P, et al. Review of 43 osteomas of the craniomaxillofacial region. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70:1093-1095
- Rao S, Rao S, Pramod DS. Transoral removal of peripheral osteoma at sigmoid notch of the mandible. *J Maxillofac Oral Surg* 2015;14(suppl 1):S255-S257
- Almeida LE, De Oliveira Filho MA. Giant mandibular condyle osteoma. *J Craniofacial Surg* 2011;22:1147-1149
- Herford AS, Stoffella E, Tandon R. Osteomas involving the facial skeleton: a report of 2 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2013;115:e1-e6
- Kaplan I, Caldeon S, Buchner A. Peripheral osteoma of the mandible: a study of 10 new cases and analysis of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:467-470
- Kerckhaert A, Wolvius E, Van der Wal K, et al. A giant osteoma of the mandible: case report. *J Craniofacial Surg* 2005;33:282-285
- Zaccardi VB, Smith JA. Osteoma of the maxillary antrum. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;80:378-379
- Ivy RH. Benign bony enlargement of the condyloid process of the mandible. *Ann Surg* 1927;85:27-30
- Yonezu H, Wakoh M, Otonari T, et al. Osteoma of mandibular condyle as cause of acute pain and limited-mouth-opening: case report. *Bull Tokyo Dent Coll* 2007;48:193-197
- Furumoto EC, Rocha JRM, Heitz C. Osteoma of the zygomatic arch—report of a case. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:310-311
- Sayan NB, Uçok C, Karasu HA, et al. Peripheral osteoma of the oral and maxillofacial region: a study of 35 new cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:1299-1301
- Johann AC, de Freitas JB, de Aguiar MC, et al. Peripheral osteoma of the mandible: case report and review of the literature. *J Craniofacial Surg* 2005;33:276-281
- Larrea-Oyarbide N, Valmaseda-Castellón E, Berini-Aytés L, et al. Osteomas of the craniomaxillofacial region. Review of 106 cases. *J Oral Pathol Med* 2008;37:38-42
- Shetty SK, Biddappa L. Recurrence of a giant peripheral osteoma of mandible. *J Maxillofac Oral Surg* 2015;14(suppl 1):S452-S456

## UNCITED REFERENCE

12.

AQ5



**SCS**  
Manuscript No. -17-0574

**Journal of Craniofacial Surgery**

Dear Author,

During the preparation of your manuscript for typesetting, some queries have arisen. These are listed below. Please check your typeset proof carefully and mark any corrections in the margin as neatly as possible or compile them as a separate list. This form should then be returned with your marked proof/list of corrections to the Production Editor.

<b>QUERIES: to be answered by AUTHOR</b>		
QUERY NO.	QUERY DETAILS	RESPONSE
<AQ1>	Please confirm whether surnames/family names (red) have been identified correctly in the author byline.	
<AQ2>	Per style each author will be listed with a maximum of two academic degrees. Please indicate which supernumerary degrees should be removed.	
<AQ3>	Affiliations have been set as per style. Please check for accuracy of information.	
<AQ4>	Please check and confirm the corresponding author's name and relevant details for correctness.	
<AQ5>	As per style, all references given in the bibliographic list must be cited in the text. Please cite reference [12] in the text.	
<AQ6>	Per company policy, a consent form must accompany any subject facial image in order to conform to the privacy guidelines. This consent form must be printed in English. If the consent form originally appears in a non-English language, a translation of the consent form must be included. Please provide the consent form for the image(s). If you are unable to provide this, the image(s) will be removed from the article.	





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria Acadêmica  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [proacad@pucrs.br](mailto:proacad@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br/proacad](http://www.pucrs.br/proacad)